

Université de Montréal

Localisation des récepteurs pour le TGF- β
dans la peau saine et dans des plaies
chez le cheval

par

ISABELLE DE MARTIN

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option biomédecine

mai 2003

©Isabelle De Martin, 2003



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Localisation des récepteurs pour le TGF- β
dans la peau saine et dans des plaies
chez le cheval

présenté par

Isabelle De Martin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. André Bisailon, président-rapporteur

Dr. Christine Théorêt, directrice de recherche

Dr. Sheila Laverty, membre du jury

RÉSUMÉ

La cicatrisation pathologique survient communément au niveau des plaies appendiculaires du cheval et requiert des soins coûteux et prolongés. Une granulation excessive (bouton de chair) ralentit les phases subséquentes de la guérison et résulte en une cicatrice inesthétique et non-fonctionnelle.

Le TGF- β joue un rôle crucial dans la réparation et le remodelage tissulaire. Cette protéine est fortement exprimée selon un patron spatial et temporel distinct lors de la cicatrisation chez le cheval. Puisque la présence de récepteurs détermine la réponse cellulaire au TGF- β , nous avons examiné, par immunohistochimie, leur localisation lors de cicatrisation appendiculaire et thoracique chez le cheval, jusqu'à 14 jours après lésion.

RI et RII sont colocalisés dans la peau normale et lésée et sont présents dans le même type cellulaire que la protéine TGF- β_1 . Il n'existe pas de différences qualitatives entre les plaies appendiculaires et thoraciques, ni entre celles provenant de membres qui guérissent normalement ou qui développent un bouton de chair. Cependant, en vertu de la cellularité accrue du bouton de chair, l'intensité immunocolorante des plaies appendiculaires développant un tissu de granulation excessif surpasse grandement celle des plaies appendiculaires guérissant normalement et celle des plaies thoraciques, durant la phase proliférative de réparation.

La forte présence de RI et RII, surtout dans les plaies développant un bouton de chair, suggère que les mécanismes de signalement nécessaires à la stimulation autocrine et paracrine de la production de protéines matricielles sont en place pour contribuer à la cicatrisation excessive. Cette information pourrait déterminer le moment opportun d'utiliser des antagonistes aux récepteurs afin de prévenir la cicatrisation pathologique des plaies appendiculaires chez le cheval.

Mots-clés : cheval, tissu de granulation excessif, guérison de plaie, peau, *transforming growth factor-beta*, récepteur, fibroprolifération.

ABSTRACT

Cutaneous wounds occur commonly in horses and often require expensive and prolonged treatment. Healing may be associated with the formation of exuberant granulation tissue (EGT), also known as proud flesh, and subsequent retardation of epithelialization and contraction, especially when wounds are located on the limb.

TGF- β plays a critical regulatory role in the processes of tissue repair and remodelling. Previous studies show that TGF- β is widely expressed in distinct spatial and temporal patterns throughout equine wound repair.

As the presence of TGF- β receptors determines cellular responsiveness, we have currently examined, by immunohistochemistry, the localization of RI and RII up to 14 days after wounding. Expression of RI and RII was co-localized in both unwounded and wounded skin and was present in the same cell types as TGF- β_1 ligand. There were no qualitative differences between tissues obtained from the limb and the thorax, or between those obtained from normally-healing limb wounds and limb wounds developing EGT, at any timepoint during the study. However, by virtue of the increased cellularity within EGT, immunostaining intensity of limb wounds exhibiting proud flesh greatly surpassed that of limb wounds healing normally and of thoracic wounds, during the proliferative phase of repair.

Strong expression of RI and RII, particularly in limb wounds developing EGT, suggests that the signaling machinery for autocrine and paracrine stimulation of matrix proteins is in place to contribute to scarring. This information may help determine the appropriate time for using receptor antagonists to prevent scarring of limb wounds of horses.

Keywords: horse, excessive granulation tissue, wound healing, skin, *transforming growth factor-beta*, receptor, fibroproliferation.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	i
RÉSUMÉ EN ANGLAIS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
REMERCIEMENTS	ix
1 INTRODUCTION	1
2 RECENSION DE LA LITTÉRATURE	5
2.1 Guérison de plaie dermique	5
2.1.1 Inflammation	5
2.1.1.1 Plaquettes	5
2.1.1.2 Mastocytes	9
2.1.1.3 Neutrophiles	10
2.1.1.4 Monocytes / Macrophages	13
2.1.2 Résolution de l'inflammation	15
2.1.3 Prolifération	17
2.1.3.1 Cellules épithéliales (réépithélialisation)	17
2.1.3.2 Cellules endothéliales (angiogénèse)	21
2.1.3.3 Fibroblastes (fibroplasie)	25
2.1.3.4 Myofibroblastes (contraction)	27
2.1.4 Synthèse et remodelage tissulaire	29
2.1.4.1 Fibronectine	29
2.1.4.2 Hyaluronane	29
2.1.4.3 Protéoglycanes	30
2.1.4.4 Collagène	31
2.2 TGF- β	32
2.2.1 Structure moléculaire	32
2.2.2 Mécanismes d'activation	34
2.2.3 Voie de signallement	35
2.2.4 Expression du TGF- β et de ses récepteurs	37

2.2.5	Effets biologiques sur la réparation tissulaire	39
2.2.5.1	Chémotaxie	40
2.2.5.2	Angiogénèse	41
2.2.5.3	Synthèse du tissu de granulation	41
2.2.5.4	Réépithélialisation	42
2.2.5.5	Contraction	42
2.2.5.6	Cicatrisation	43
2.3	Guérison de plaie dermique chez le cheval	44
2.3.1	Guérison par intention secondaire	44
2.3.2	Rôles du TGF- β et de ses récepteurs	46
3	MÉTHODOLOGIE	49
3.1	Chevaux	49
3.2	Procédure chirurgicale	49
3.3	Prélèvement des échantillons	50
3.4	Immunohistochimie	50
4	ARTICLE SOUMIS	52
5	DISCUSSION	73
6	CONCLUSION	77
7	BIBLIOGRAPHIE	78

LISTE DES TABLEAUX

A) Revue de littérature:

Tableau I: Effets biologiques de la protéine TGF- β sur différents types cellulaires lors de la réparation tissulaire. p.39

B) Article soumis:

Tableau I: Temporal differences between TGF- β 1 ligand, RI/RII immunostaining. p.65

LISTE DES FIGURES

A) Revue de littérature:

- Figure 1: Mécanisme général de l'adhésion plaquettaire. p. 7
- Figure 2: Représentation schématique des quatre couches de l'épiderme. p. 18
- Figure 3: Étapes de l'angiogénèse. p. 22
- Figure 4: Représentation schématique du petit et du gros complexe latent. p. 33
- Figure 5: Voie de signallement du TGF- β . p. 36

B) Article soumis:

- Figure 1a: Immunohistochemical localization of TGF- β RI in normal, uninjured equine thoracic skin (10 X). p. 63
- Figure 1b: Immunohistochemical localization of TGF- β RI in normal, uninjured equine thoracic skin (10 X). Negative control. p. 63
- Figure 2: Immunohistochemical localization of TGF- β RI in normal, uninjured equine thoracic skin (60 X). p. 63
- Figure 3: Immunohistochemical localization of TGF- β RI in an equine limb wound at 14 days (10 X). p. 63
- Figure 4: Immunohistochemical localization of TGF- β RI in an equine limb wound at 14 days (60X). p. 64
- Figure 5: Immunohistochemical localization of TGF- β RII in exuberant granulation tissue having developed in an equine bandaged limb wound at 10 days (60X). p. 64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine diphosphate
α_2 M	Alpha ₂ -macroglobuline
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes (basic fibroblast growth factor)
BMPs	Protéines morphogéniques de l'os (bone morphogenetic proteins)
CD62E	E-sélectine
CD62P	P-sélectine
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif (connective tissue growth factor)
EGF	Facteur de croissance épidermal (epidermal growth factor)
FAST	Forkhead activin signal transducer
FYVE	Domaine double doigt de zinc
GPIa/IIa	Glycoprotéine plaquettaire Ia/IIa
GPIb/IX	Glycoprotéine plaquettaire Ib/IX
GM-CSF	Facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor)
ICAM	Molécule d'adhésion intracellulaire (intracellular adhesion molecule)
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IGF	Facteur de croissance mimant l'insuline (insulinlike growth factor)
IFN	Interféron
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes (keratinocyte growth factor)
LAP	Protéine associé à la latence (latency associated protein)
LTBP	Protéine de liaison du TGF- β latent (latent TGF- β binding protein)
MCP	Protéine de chémoattraction des monocytes (monocytes chemoattractant protein)
MDGF	Facteur de croissance dérivé des macrophages (macrophage-derived growth factor)
MEC	Matrice extracellulaire

MIP	Protéine d'inhibition des monocytes (monocytes inhibitory protein)
ML	Musculaire lisse
MMPs	Métalloprotéinases de la matrice (matrix metalloproteinases)
NO	Oxyde nitrique (nitrogen oxyde)
PA	Activateur du plasminogène (plasminogen activator)
PAF	Facteur d'activation plaquettaire (platelet-activating factor)
PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène (plasminogen activatpr inhibitor)
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor)
PECAM	Molécule d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales (platelet endothelial cell adhesion molecule)
PF	Facteur plaquettaire (platelet factor)
RI	Récepteur I du TGF- β
RII	Récepteur II du TGF- β
R-Smad	Récepteur Smad régulé (regulated Smad receptor)
SARA	Ancrage des Smads pour l'activation du récepteur (Smad anchor for receptor activation)
TGF	Facteur de croissance transformant (transforming growth factor)
TIMPs	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (tissue inhibitor of metalloproteinases)
TNF	Facteur de nécrose tumorale (tumoral necrosis factor)
TSP	Thrombospondine-1
u-PA	Activateur du plasminogène de type urokinase (urokinase-type plasminogen activator)
VCAM	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires (vascular cell surface adhesion molecule)
VEGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (vascular endothelial cell growth factor)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr. Bruce D. Murphy ainsi que Mira Dobias-Goff sans qui cette expérimentation n'aurait été possible.

Je tiens également à remercier la Dre. Christine Théorêt qui m'a aidé à me rendre où je suis aujourd'hui.

1 INTRODUCTION

La plus importante caractéristique des organismes vivants est probablement leur capacité de s'auto-réparer. Deux processus sont impliqués dans la guérison de la plupart des plaies, soit la réparation et la régénération. La régénération est le remplacement des tissus détruits par les mêmes cellules que celles qui ont été perdues. Cela n'est possible que dans les tissus possédant une population soutenue de cellules capables de se diviser mitotiquement, comme l'épithélium, le foie et les os. Par contre, la réparation sert à rétablir la continuité interrompue des tissus (Clark, 1996). Le tissu qui est formé afin de rétablir cette continuité ne contient pas tous les éléments différenciés du tissu original, ce qui forme ultimement un tissu non-fonctionnel, c'est-à-dire une cicatrice. La cicatrization provoque souvent des effets adverses sur la fonction et la croissance, de même qu'une apparence cosmétique indésirable.

La guérison de plaie suit un patron prévisible. Elle peut être divisée en trois phases qui se superposent dans le temps: l'inflammation aiguë; la phase proliférative qui est caractérisée par une prolifération de fibroblastes ainsi que de cellules endothéliales et épithéliales et finalement le remodelage tissulaire qui conduit à la formation d'une cicatrice (Clark, 1996). La guérison de plaie est étroitement régulée par une cascade de médiateurs, dont les cytokines et les facteurs de croissance. Lorsqu'il se produit une lésion, la production et la sécrétion de cytokines par les plaquettes et les macrophages situés en bordure de la plaie sont induites et les processus d'inflammation et de guérison peuvent procéder. Même si plusieurs cytokines sont impliquées, le facteur de croissance transformant (TGF)- β semble être le plus important (Robert et Sporn, 1996).

Suite à une lésion, la production de TGF- β favorise la chémoattraction des monocytes et des macrophages, de même que l'attraction et la prolifération des fibroblastes. Le TGF- β stimule également la synthèse de protéines matricielles comme la fibronectine, le collagène et les glycosaminoglycanes, de même que la synthèse

d'inhibiteurs de protéinases, tout en inhibant la sécrétion de protéinases, favorisant ainsi l'accumulation de matrice extracellulaire [MEC]] (Roberts et Sporn, 1996).

Les blessures cutanées surviennent communément chez le cheval et exigent souvent des traitements coûteux et prolongés. La guérison par intention secondaire est nécessaire lorsque la plaie ne peut pas être suturée et cela se produit particulièrement au niveau de la portion distale des membres. La tension excessive de la peau, la contamination extrême de la plaie et la perte massive de tissu dans ces endroits écartent fréquemment la possibilité de guérison par fermeture primaire (Bertone, 1989). La guérison par intention secondaire dépend de la formation d'un nouveau tissu conjonctif et de l'angiogénèse, de la contraction pour diminuer la taille de la blessure et de la réépithélialisation pour couvrir la surface lésée (Fretz et coll., 1983). Cependant, ce mode de guérison est souvent associé à des complications spécifiques à l'aspect distal des membres du cheval, comme la formation d'un tissu de granulation exubérant aussi appelé bouton de chair (Jacobs et coll., 1984). Le bouton de chair provoque un ralentissement de la contraction et de la réépithélialisation, conduisant éventuellement à une cicatrice inesthétique et non-fonctionnelle. Lorsqu'elles sont comparées aux plaies du thorax, les plaies des membres contractent moins et ont un plus faible taux de réépithélialisation (Jacobs et coll., 1984). À part les corticostéroïdes, aucun traitement connu actuellement ne conduit de façon systématique à la prévention du bouton de chair, ce qui n'est pas surprenant, puisque sa pathogénèse n'a pas encore été établie.

Le TGF- β joue un rôle très important dans le processus de réparation du derme et ce chez plusieurs espèces animales. On peut observer des concentrations élevées de TGF- β durant toute la phase proliférative au niveau des plaies des membres équin, alors que ces concentrations retournent à des valeurs de base dans les plaies du thorax (Théorêt et coll., 2001), ce qui suggère qu'une production persistante de TGF- β serait liée à la fibrose cutanée chez le cheval, puisque ce sont les plaies des membres qui sont prédisposées au développement de boutons de chair alors que les plaies thoraciques guérissent normalement. Des études antérieures ont déjà démontré par immunohistochimie que ce sont les macrophages et les fibroblastes qui sont responsables de la production de TGF- β (Théorêt et coll., 2002a). Cependant, il n'a pas encore été établi de façon significative que l'expression du TGF- β dans les plaies

formant un bouton de chair soit plus élevée que dans les plaies cicatrisant normalement (Théorêt et coll., 2002b).

Il a récemment été proposé que l'accumulation temporaire d'une sous-population de fibroblastes possédant des capacités accrues de répondre au TGF- β puisse exister dans les plaies cutanées guérissant de façon pathologique (Sempowski et coll., 1995). Il a également été postulé que cette réponse accrue serait liée à l'expression d'un plus grand nombre de récepteurs pour le TGF- β à la surface des fibroblastes. (Shmid et coll., 1998) Donc, même si les concentrations de TGF- β dans les plaies appendiculaires qui cicatrisent normalement et dans celles qui développent un bouton de chair sont semblables, les fibroblastes du bouton de chair pourraient être plus réceptifs au TGF- β . C'est pourquoi nous avons voulu étudier la localisation cellulaire des récepteurs pour le TGF- β dans des échantillons provenant de plaies du thorax et de membres équins qui guérissent normalement et de plaies de membres qui développent un bouton de chair. Cette information pourrait aider à déterminer le moment approprié pour l'usage d'antagonistes aux récepteurs afin de prévenir la cicatrisation pathologique si fréquente au niveau des membres chez le cheval. Selon nos hypothèses, la présence de récepteurs pour le TGF- β persiste dans les fibroblastes des plaies appendiculaires par rapport aux plaies thoraciques. Nous croyons également que la présence de récepteurs pour le TGF- β persiste dans les fibroblastes de plaies appendiculaires guérissant en formant un bouton de chair par rapport à ceux provenant de plaies appendiculaires guérissant normalement.

Les échantillons tissulaires nécessaires ont été prélevés sur huit chevaux, qui ont été placés de façon aléatoire dans deux groupes d'animaux. Le premier groupe a été utilisé pour étudier la cicatrisation normale de plaie sur les membres et le thorax, alors que le deuxième groupe a servi à l'étude de la guérison normale et pathologique des membres, pour laquelle les plaies ont été mises sous bandage durant toute la période de l'étude, soit 14 jours, afin de créer un bouton de chair expérimental (Barber, 1990). Des plaies cutanées de pleine épaisseur ont été créées à la face latérale de la région métacarpienne et de la paroi thoracique. Ces plaies n'ont pas été suturées. Des biopsies ont été effectuées à 12 et 24 heures, puis à deux, cinq, dix et 14 jours après la chirurgie. La localisation des récepteurs pour le TGF- β a été effectuée par immunohistochimie, à

l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin. L'intensité immunocolorante des tissus a été évaluée, par examen visuel, par deux évaluateurs indépendants.

2 RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Guérison de plaie dermique

2.1.1 Inflammation

Chez les adultes, la cicatrisation est un processus hautement inflammatoire. L'inflammation est une réponse vasculaire et cellulaire qui défend le corps contre les substances étrangères et dispose des tissus morts afin que la réparation puisse procéder. Son intensité est généralement corrélée avec la sévérité du trauma. Il y a quatre types de cellules qui jouent un rôle principal lors d'une inflammation: les plaquettes, les mastocytes, les neutrophiles et les macrophages.

2.1.1.1 Plaquettes

Les plaquettes ne sont pas de vraies cellules. Ce sont des fragments cytoplasmiques de cellules extraordinairement grosses, les mégacaryocytes de la moelle osseuse. Les plaquettes ne contiennent pas de noyau et ont une forme biconvexe. Elles possèdent trois types d'organelles de stockage. Les granules alpha sont le site de stockage des protéines spécifiques aux plaquettes et des glycoprotéines adhésives. Les granules delta, ou corps denses, sont le site de stockage des amines biogènes, comme la sérotonine, qui permet la vasoconstriction. Les granules lambda, ou lysosomes, contiennent quant à eux des hydrolases neutres et acides. La durée de vie des plaquettes est de cinq à dix jours (Marieb, 1999), après quoi elles sont enlevées de la circulation par le système réticulo-endothélial et détruites dans la rate.

La principale fonction des plaquettes est d'assurer l'hémostase en formant et en consolidant un caillot de fibrine et de cellules qui obture temporairement l'ouverture présente dans le vaisseau sanguin. Comme elles réagissent en réponse à une

perturbation de l'intégrité vasculaire, les plaquettes sont les premières à promouvoir l'inflammation. Lorsqu'elles sont activées, elles relâchent des médiateurs inflammatoires préformés ou synthétisés *de novo*. Ces médiateurs vont moduler le tonus et la perméabilité vasculaire, attirer des cellules inflammatoires, détruire des tissus et provoquer la mitogénèse des cellules du tissu conjonctif. Pour ces fonctions, les granules alpha sont particulièrement intéressants, puisqu'ils contiennent des médiateurs impliqués dans l'hémostase, ainsi que des chémoattractants et des mitogènes, qui vont stimuler les phases subséquentes de la réparation. La liste de protéines des granules alpha connues pour jouer un rôle dans la réparation de plaie inclut les facteurs de coagulation (ex: facteur V), les glycoprotéines adhésives (ex: fibrinogène, facteur von Willebrand et thrombospondine), les protéines plasmatiques (ex: immunoglobulines (Ig) G et albumine), les mitogènes cellulaires [ex: facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), TGF- α , TGF- β et facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF)] et les inhibiteurs de protéinases [ex: α_2 -macroglobuline et α_2 -antiplasmine] (Faloon et coll., 1986).

Généralement, les plaquettes n'adhèrent ni les unes aux autres ni à l'endothélium lisse des vaisseaux sanguins. Mais dès que l'endothélium est endommagé, cela favorise l'adsorption et l'activation de pro-enzymes spécifiques de la cascade de coagulation (Fig. 1). L'adhésion plaquettaire est contrôlée par l'adhésion de la glycoprotéine plaquettaire Ia/IIa (GPIa/IIa) au collagène et de la glycoprotéine plaquettaire Ib/IX (GPIb/IX ou $\alpha_{IIb}\beta_3$ intégrine) à une glycoprotéine adhésive provenant de la matrice subendothéliale et du plasma, le facteur von Willebrand. La glycoprotéine GPIb/IX est un récepteur qui est exprimé de façon constitutive au niveau de la membrane plasmatique des plaquettes. Sa liaison au facteur von Willebrand initie une voie de signallement intracellulaire et un flux de calcium qui conduisent à l'activation de la glycoprotéine de la surface plaquettaire GPIIb/IIIa, qui peut alors lier le fibrinogène (Andrews et coll., 1997). Ce dernier permet de faire le pont entre deux plaquettes, afin de stabiliser l'agrégat plaquettaire. Une fois que les plaquettes sont agrégées, elles peuvent être activées par des facteurs hémostatiques traditionnels, comme la thrombine, l'adénosine diphosphate (ADP) et les dérivés de l'acide arachidonique. D'autres agents, comme le facteur d'activation plaquettaire (PAF), un phospholipide relâché par les

Les plaquettes activées subissent des changements structuraux et fonctionnels impliqués dans la coagulation. Leur forme change d'un disque mou à une sphère projetant des pseudopodes. Ce changement de forme conduit à une augmentation de l'adhésion et favorise la liaison à d'autres plaquettes. Elles réarrangent également les phospholipoprotéines de leurs membranes, permettant au facteur V de coagulation de se lier aux plaquettes (Wahl et Wahl, 1992). La coagulation peut alors emprunter la voie intrinsèque ou la voie extrinsèque. Dans la voie intrinsèque, plus lente, tous les facteurs nécessaires à la coagulation sont présents dans le sang (Marieb, 1999). La coagulation est initiée par l'adsorption du facteur de Hageman aux fibrilles de collagène. En revanche, lorsque le sang est exposé à la thromboplastine tissulaire, ou facteur tissulaire, qui est libéré par les cellules endommagées, le mécanisme extrinsèque se déclenche (Marieb 1999). La thromboplastine active le facteur VII, ce qui permet de sauter complètement plusieurs étapes de la voie intrinsèque. Cependant, les deux voies conduisent à l'activation de la prothrombinase, qui catalyse la conversion de la prothrombine en thrombine. La thrombine permet d'enlever sélectivement certains peptides des molécules de fibrinogène, une protéine plasmatique produite par le foie, et les transforme en monomères de fibrine. Ces protéines sont d'abord solubles, mais comme elles se polymérisent pour donner des filaments, elles deviennent insolubles. Ces filaments peuvent alors s'attacher aux plaquettes et s'entremêler pour former la charpente du caillot, laquelle emprisonne les globules rouges, rendant le caillot imperméable au plasma. Ainsi, la lésion est scellée, ce qui prévient un saignement subséquent (Wahl et Wahl, 1992).

Le caillot sanguin procure également une matrice provisoire pour la migration cellulaire. Cette matrice est composée de fibrine, de fibronectine de vitronectine, du facteur von Willebrand et de thrombospondine. Les cellules utilisent des récepteurs à intégrines qui reconnaissent les composantes de cette matrice pour se déplacer dans la plaie. Avec le temps, la surface du caillot se dessèche pour former une croûte qui sera enlevée lorsque la guérison sera complétée.

Plusieurs substances relâchées par l'endothélium vasculaire empêchent le caillot d'atteindre des dimensions excessives. Elles incluent les prostacyclines qui inhibent l'agrégation plaquettaire, l'antithrombine III qui inactive la thrombine, la protéine C qui

dégrade les facteurs V et VIII de coagulation et l'activateur du plasminogène (PA) qui initie la lyse du caillot (Marieb, 1999).

Les plaquettes ont deux fonctions. L'agrégation plaquettaire et la coagulation sanguine assurent en effet l'hémostase et procurent une charpente pour la migration cellulaire. Mais les plaquettes relâchent également de puissants facteurs chimiotactiques et mitogènes, comme le PDGF, le TGF- α , le TGF- β et le facteur de croissance épidermique (EGF), qui seront nécessaires pour les stades subséquents de la réparation de plaie et la génération de nouveaux tissus (Clark, 1996). Elles jouent donc un rôle majeur dans la guérison de plaie.

2.1.1.2 Mastocytes

Les mastocytes ne sont pas simplement des cellules qui favorisent les réactions allergiques aiguës. Ils semblent également contribuer aux premiers stades de la guérison de plaie, grâce aux nombreux médiateurs inflammatoires qu'ils relâchent.

Les mastocytes sont de grosses cellules rondes (15 à 20 μm de diamètre) qui sont dérivées d'un précurseur hématopoïétique. Ils sont distribués dans le tissu conjonctif, mais leur lieu de prédilection se situe à l'interface hôte-environnement (la peau, les voies respiratoires et le tractus gastro-intestinal), où ils sont surtout concentrés autour des petits vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que des nerfs (Hebda et coll., 1993). Les mastocytes possèdent des récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines (Ig) E. Ils effectuent également des contacts intercellulaires spécialisés avec les cellules endothéliales et/ou les fibroblastes. Ces contacts peuvent permettre un transport bidirectionnel de molécules régulatrices entre les mastocytes et d'autres populations cellulaires (Hebda et coll., 1993). Leur caractéristique morphologique la plus frappante est que leur cytoplasme est rempli de gros granules, qui masquent habituellement le noyau. Ces granules contiennent de nombreux médiateurs inflammatoires préformés, comme l'histamine, l'héparine, des chémoattractants pour les neutrophiles et les éosinophiles (Tizard, 1982) et des protéinases sériques (Hebda et coll., 1993). Ces médiateurs sont relâchés lors de la dégranulation des mastocytes, qui se produit en présence d'IgE, des fragments C3a et C5a du complément, de neuropeptides ou de

cytokines (Nilsson et coll., 1999). Les mastocytes peuvent également libérer des médiateurs synthétisés *de novo*, comme les dérivés de l'acide arachidonique (leukotriènes et prostacycline) qui favorisent la chimiotaxie des neutrophiles et la vasodilatation (Tizard, 1982), ainsi que de nombreuses cytokines (Nilsson et coll., 1999).

L'histamine est associée à une vasodilatation et à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ce phénomène est dû à un espacement entre les cellules endothéliales, ce qui permet l'extravasation de fluide, de cellules et de molécules aussi grosses que de petites protéines dans l'espace périvasculaire (Katzung 1998). L'histamine augmente également la prolifération des cellules endothéliales et des fibroblastes, ce qui suggère un rôle dans l'angiogénèse et la guérison de plaie (Marks et coll., 1986). La production de cytokines comme les interleukines (IL)-1,-3,-4,-5 et -6, le facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), le facteur de nécrose tumorale (TNF) α et le TGF- β_1 par les mastocytes affecte l'inflammation, l'hémostase, l'hématopoïèse, l'angiogénèse et le remodelage tissulaire.

2.1.1.3 Neutrophiles

Les neutrophiles forment la première ligne de défense dans les plaies qui sont contaminées. Ce sont des cellules rondes d'environ 12 μm de diamètre (Tizard, 1982). L'influx de neutrophiles débute tôt et leur nombre augmente de façon stable pour atteindre un pic dans les tissus endommagés 24 à 48 heures après l'initiation de la lésion (Riches, 1996). Même si les neutrophiles et les monocytes commencent à migrer simultanément dans le tissu lésé, les neutrophiles arrivent les premiers, surtout à cause de leur abondance relative dans la circulation et de leur rapide capacité de locomotion. La principale fonction des neutrophiles est de détruire les bactéries par phagocytose et par des mécanismes enzymatiques (relâche de protéinases et radicaux libres de l'oxygène), procurant ainsi un environnement favorable pour la guérison de la plaie. Ils sont également une source importante de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- α et le TGF- β . Cependant, les neutrophiles ne semblent pas être essentiels dans le

processus de réparation si les plaies ne sont pas contaminées (Clark, 1996). En effet, la réparation de plaie chez le cochon d'Inde déplété en neutrophiles circulants procède normalement (Simpson et Ross, 1972).

Plusieurs facteurs chimotactiques attirent les neutrophiles au site de lésion. Ces chemoattractants incluent les fibrinopeptides clivés du fibrinogène par la thrombine, les produits de dégradation de la fibrine par la plasmine, le fragment C5a provenant de la voie classique ou alterne du complément, le leukotriène B₄ relâché par les neutrophiles activés, le PAF relâché par les cellules endothéliales et les neutrophiles activés, l'IL-8 sécrétée par les cellules endothéliales ainsi que le PDGF et le facteur plaquettaire (PF)-4 relâchés par les plaquettes (Clark, 1996). En plus de procurer un stimulus pour la migration, ces facteurs chimotactiques augmentent l'expression du récepteur CD11/CD18 (deux intégrines) à la surface des neutrophiles. Ces complexes hétérodimériques, avec le facteur sialyl-Lewis X, médient l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, facilitant leur migration à travers l'endothélium (Clark, 1996).

Le recrutement des leucocytes (neutrophiles et monocytes) dans la plaie à partir de la circulation sanguine est médié par les processus de roulement, d'activation, d'adhésion serrée et de transmigration à travers l'endothélium (Menger et Vollmar, 1996). L'attachement initial, associé au roulement des leucocytes, est habituellement médié par des molécules d'adhésion de la famille des sélectines. Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires. Lorsqu'elles sont stimulées par des médiateurs inflammatoires, les cellules endothéliales expriment deux sélectines: la E- et la P-sélectine [CD62E et CD62P] (Tizard, 2000). Ces dernières interagissent avec le facteur sialyl-Lewis X, exprimé à la surface des leucocytes. L'attachement ferme est médié par l'interaction des intégrines des leucocytes avec les molécules d'adhésion de la superfamille des Ig (molécule d'adhésion intercellulaire: ICAM) des cellules endothéliales. Cela inclut l'interaction des β_2 intégrines (CD11/CD18) avec les ICAM-1 et ICAM-2, qui sont régulées positivement à la surface des cellules endothéliales activées par des cytokines [IL-1 α et β et TNF- α] (Tizard, 2000). L' $\alpha_4\beta_1$ intégrine des leucocytes interagit également avec une molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM), VCAM-1. Ces interactions médiées par les intégrines sont capables de

transmettre un signal aux leucocytes, conduisant à une réorganisation de leur cytosquelette et à leur étalement sur la surface endothéliale. En général, les intégrines des leucocytes sont inactives sur les cellules circulantes. Donc, une étape d'activation des leucocytes est préalable à l'attachement initial et la ferme adhésion à l'endothélium activé. Les leucocytes peuvent être activés par l'engagement de la E- et la P-sélectine, par des médiateurs solubles (leukotriène B₄ et fragment C5a) ou par des chémokines produites au site de réponse vasculaire [IL-8 et protéine de chémoattraction des monocytes (MCP)-1] (Zimmerman et coll., 1992). Les leucocytes migrent entre les cellules endothéliales en étendant d'abord des pseudopodes et en passant ensuite à travers les jonctions intercellulaires, qui se referment immédiatement après leur passage (Silverstein, 1999). La molécule d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales (PECAM)-1, une molécule de la superfamille des Ig exprimée de façon constitutive à la surface des cellules endothéliales, est nécessaire à ce dernier processus (Muller et coll., 1993). Cette protéine est exprimée par les leucocytes et par les cellules endothéliales.

L'activation des neutrophiles par des chémoattractants stimule également la relâche d'élastase et de collagénase, qui facilitent la pénétration des cellules à travers la membrane basale vasculaire. La diapédèse des neutrophiles est facilitée par l'augmentation de la perméabilité suite à la relâche d'agents vasodilatateurs comme l'histamine (Wahl et Wahl, 1992).

Si la plaie n'est pas trop contaminée, l'infiltration de neutrophiles cesse après quelques jours. La plupart des neutrophiles sont emprisonnés dans le caillot de la plaie et les tissus desséchés. Cette croûte tombe durant la réparation tissulaire. Les neutrophiles qui sont présents dans les tissus viables deviennent sénescents en quelques jours et sont phagocytés par les macrophages tissulaires (Clark, 1996). Cela marque la fin de la phase d'inflammation aiguë de la réparation de plaie. Cependant, une contamination substantielle de la plaie peut provoquer une réponse inflammatoire riche en neutrophiles qui persiste au delà de cette période (Clark, 1996).

2.1.1.4 Monocytes/macrophages

Que l'infiltration des neutrophiles dans la lésion persiste ou soit résolue, l'accumulation de monocytes se poursuit. Elle est stimulée par des chémoattractants exogènes ou endogènes spécifiques aux monocytes, qui sont d'abord générés à partir de précurseurs protéiques préformés et ensuite exprimés localement par les cellules résidentes et infiltrantes de la plaie. La rupture des capillaires conduit à l'extravasation du plasma et des constituants sanguins, à l'agrégation et à l'activation plaquettaire, à l'activation de la cascade de coagulation et à la génération de composantes actives du complément et de kinines (Clark, 1996). Plusieurs de ces produits sont des facteurs chimiotactiques pour les cellules inflammatoires et procurent les signaux nécessaires pour une première vague de migration de ces cellules dans l'espace inflammatoire. Une fois dans la plaie, ces cellules, particulièrement les monocytes/macrophages, expriment un répertoire étendu de facteurs chimiotactiques, qui attirent et activent d'autres cellules inflammatoires, amplifiant la réponse inflammatoire et procurant plus tard les signaux nécessaires pour attirer spécifiquement d'autres monocytes/macrophages. Les facteurs chimiotactiques pour les monocytes incluent les fragments de collagène, l'élastine, la fibronectine, la thrombine active, le PF-4, les facteurs de croissance PDGF et TGF- β , les chémokines MCP-1, -2 et -3 (Ham et coll., 1991), les protéines d'inhibition des monocytes (MIP) 1 α et β (Sherry et coll., 1988) et les cytokines IL-1 β et TNF- α .

L'implication des macrophages dans la lésion est étroitement dépendante de l'influx de monocytes sanguins. Alors qu'il y a peu de doute concernant l'origine des monocytes sanguins (la moelle osseuse), il existe un débat considérable concernant l'origine des macrophages tissulaires (production locale versus influx de monocytes). Selon toute probabilité, les macrophages résidents proviennent des deux sources. Sous des conditions stables, les macrophages sont surtout remplacés par une réplication locale, alors que les monocytes migrent à travers les vaisseaux sanguins des tissus afin d'assurer une surveillance. Sous des conditions inflammatoires, l'augmentation rapide du nombre de macrophages est surtout due à la migration de monocytes circulants, qui se différencient ensuite en macrophages pour assister ceux qui sont déjà présents.

Quand le nombre de neutrophiles commence à décliner, la population de macrophages augmente pour remplacer les neutrophiles en tant que phagocytes de la plaie. Les macrophages demeurent dans la plaie pendant quelques semaines, durant lesquelles ils relâchent des enzymes, telle la collagénase, pour faciliter le débridement tissulaire. Ils s'occupent également de la phagocytose des organismes pathogènes et des neutrophiles inutiles, ainsi que de l'orchestration des phases subséquentes de la réparation tissulaire. D'ailleurs, une déplétion combinée des monocytes circulants et des macrophages tissulaires chez le cochon d'Inde résulte non seulement en un sévère retard du débridement tissulaire, mais aussi en un délai marqué de la prolifération des fibroblastes avec fibrose subséquente de la plaie (Leibovitch et Ross, 1975). Cela indique donc que, contrairement aux neutrophiles, les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'orchestration et l'exécution des phases de réparation et de dégradation de la guérison de plaie. En fait, les macrophages sont une source importante de facteurs de croissance des cellules mésenchymales, connus sous l'appellation de facteurs de croissance dérivés des macrophages (MDGF), qui stimulent la prolifération des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales. La tension réduite en oxygène dans la plaie hypoxique semble stimuler les macrophages à sécréter des cytokines à action angiogénique (bFGF, TGF- α , TGF- β , facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF), IL-8 et TNF- α), initiant la néovascularisation de la plaie. Finalement, les macrophages jouent un rôle déterminant comme source de facteurs de croissance et de cytokines contrôlant la synthèse des protéines du tissu conjonctif, en particulier le collagène, par d'autres types de cellules. Ces facteurs incluent le TGF- β , le PDGF, le facteur de croissance mimant l'insuline (IGF)-I, le bFGF et le TGF- α (Riches, 1996). En fait, contrairement aux plaquettes, qui ne sont capables que de relâcher des cytokines préformées, les macrophages sont une source continue de ces facteurs de croissance durant les phases d'inflammation, de remodelage et de fibrose. Les macrophages semblent donc jouer un rôle clé dans la transition entre l'inflammation et la réparation.

2.1.2 Résolution de l'inflammation

L'inflammation est généralement considérée comme étant une réponse bénéfique à une lésion et nécessaire à l'issue normale de la guérison de plaie. Paradoxalement, l'inflammation peut contribuer à la pathogénèse d'un grand nombre de maladies caractérisées par une fibrose et/ou une cicatrisation excessive.

Pour que l'inflammation soit résolue, les puissants médiateurs qui ont initié la réponse inflammatoire doivent d'une façon ou d'une autre être enlevés, inactivés ou rendus impuissants. Il existe différents mécanismes potentiels pour arriver à la dissipation de ces médiateurs. Ceux-ci incluent la génération de médiateurs inflammatoires instables (ex: le thromboxane A_2 et l'oxyde nitrique (NO) sont des facteurs labiles), l'inactivation par des enzymes appropriées (ex: PAF est inhibé *in vitro* par des enzymes appropriées), la dilution par la génération de l'œdème inflammatoire, l'altération de la capacité de réponse de la cellule cible [ex: les neutrophiles sont désensibilisés à des concentrations élevées d'une variété de médiateurs inflammatoires via une diminution du nombre de récepteurs à leur surface(Colditz et Movat, 1984)] et l'effet antagoniste de médiateurs (ex: l'antagoniste au récepteur de l'IL-1 inhibe l'activité de l'IL-1). Malgré ces mécanismes, pour qu'il y ait vraiment une résolution de l'inflammation, il doit absolument y avoir un arrêt de la production des médiateurs.

L'arrêt de la migration des neutrophiles se produit si tôt dans l'évolution de l'inflammation aiguë qu'elle pourrait représenter un des premiers événements de résolution. Plusieurs mécanismes hypothétiques pourraient être responsables de ce phénomène: la formation d'une barrière à la migration par l'altération des couches de cellules endothéliales et épithéliales, la génération locale d'inhibiteurs de facteurs chimotactiques, la désensibilisation des neutrophiles à des concentrations élevées de médiateurs inflammatoires, l'opération d'une boucle de rétroaction négative par laquelle les neutrophiles accumulés exercent une influence qui prévient l'entrée de nouveaux neutrophiles dans la plaie, et la dissipation ou l'enlèvement des chémoattractants (Hellewell et coll., 1991).

Durant la migration des neutrophiles à partir des vaisseaux sanguins, des jonctions gaps se forment entre les cellules endothéliales. Cependant, ces jonctions ne

sont pas associées à des dommages aux cellules endothéliales. Les jonctions gaps peuvent être induites par des médiateurs à court terme (ex: histamine et bradykinine). Ces jonctions procurent un point de contrôle pour le relargage de fluide et de protéines dans le site inflammatoire. La restauration de la perméabilité normale des microvaisseaux résulte probablement de la dissipation des médiateurs inflammatoires.

Les lésions tissulaires ne sont pas seulement médiées par l'accumulation de cellules inflammatoires. Ce sont plutôt leurs sécrétions qui produisent des dommages. Un contrôle étroit et ultimement l'arrêt de la synthèse et de la sécrétion par les cellules inflammatoires sont importants pour limiter les lésions tissulaires inflammatoires et permettre une résolution de l'inflammation. Les mécanismes par lesquels la sécrétion semble être modulée incluent l'épuisement des réserves internes d'énergie requises pour la sécrétion, la désensibilisation des récepteurs et leur régulation négative, la dissipation du stimulus, le développement de facteurs inhibiteurs et finalement, l'enlèvement ou la mort des cellules (Haslett et Henson, 1996). L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est la voie d'élimination universelle pour les cellules et les tissus devenus inutiles. Les cellules apoptotiques sont très rapidement ingérées par phagocytose, sans qu'il n'y ait un déversement de leur contenu. Par conséquent, l'apoptose se fait sans causer d'inflammation ni de lésions tissulaires locales (Greenhalgh, 1998). Habituellement, ce sont les macrophages qui sont responsables de l'ingestion des cellules apoptotiques, mais d'autres phagocytes semi-professionnels (ex: fibroblastes et cellules épithéliales) peuvent y participer (Haslett et Henson, 1996). Cependant, la phagocytose d'une particule par ce type de cellule provoque fréquemment une explosion oxydative. Lors de cette explosion, de l'oxyde nitrique (NO) et un déluge de radicaux libres de l'oxygène sont libérés. Ces substances possèdent une grande capacité de destruction cellulaire. De plus, les macrophages activés peuvent relâcher des enzymes comme l'élastase et la collagénase, qui dégradent la matrice extracellulaire (MEC). Le TGF- β exerce un effet inhibiteur surprenant sur les fonctions des macrophages, particulièrement sur l'expression des intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote. Cela permet d'inhiber la génération de ces molécules sans prévenir la phagocytose et la dégradation intracellulaire ou extracellulaire des particules ingérées. L'effet

désactivateur du TGF- β semble lié à la régulation négative des récepteurs pour les cytokines activant les macrophages [ex: interféron (IFN)- γ , et TNF- α] (Riches, 1996).

La résolution complète de l'inflammation se produit seulement lorsque le fluide, la fibrine, les débris et les cellules inflammatoires sont entièrement dispersés. La majorité du fluide et des protéines est enlevée par le drainage lymphatique, même si les macrophages peuvent jouer un rôle important en enlevant le fluide par pinocytose et endocytose. Cependant, même si on sait que les mécanismes responsables de l'arrêt de l'influx de monocytes sont semblables à ceux utilisés pour les neutrophiles, on ignore encore comment sont enlevés les macrophages une fois qu'ils ont accompli leurs fonctions au site d'inflammation.

2.1.3 Prolifération

La phase proliférative de la réparation suit l'inflammation et inclue une rapide réépithélialisation et la formation d'un tissu de granulation composé principalement de macrophages, de fibroblastes, de tissu conjonctif lâche et de nouveaux vaisseaux sanguins.

2.1.3.1 Cellules épithéliales (réépithélialisation)

L'épithélium forme la couche externe de la peau et constitue la frontière entre des milieux différents, protégeant l'intérieur de l'organisme du milieu externe. La couche externe de la peau des mammifères est constituée d'un épithélium stratifié squameux kératinisé, l'épiderme. Le derme est sous-jacent à l'épiderme et constitue la partie la plus profonde de la peau. Il comprend du tissu conjonctif dense et est la seule couche de la peau à être vascularisée. Les nutriments diffusent donc à partir des capillaires du derme, par le liquide interstitiel, jusqu'aux cellules de l'épiderme. La membrane basale est une zone mince bien définie, riche en glycoprotéines et composée principalement de laminine et de collagène de type IV. C'est au niveau de cette membrane que s'effectue la liaison entre l'épiderme et le derme. Les cellules basales

s'attachent à la membrane basale à l'aide d'hémidésmosomes, qui sont des jonctions cellulaires spécialisées. La membrane basale sert donc à amarrer l'épiderme au derme, en liant le cytosquelette des cellules épithéliales aux faisceaux de collagène du derme, par l'intermédiaire de fibrilles de collagène de type VII (Stenn et Malhotra, 1992). Le tissu cutané situé juste sous la peau est appelé hypoderme, ou fascia superficiel. Il est constitué de tissu adipeux et d'un peu de tissu conjonctif lâche. En plus d'emmagasiner des graisses afin d'isoler les tissus plus profonds de l'organisme contre les pertes de chaleur, l'hypoderme relie la peau aux structures sous-jacentes (surtout aux muscles) et lui permet de bouger et de s'étirer.

L'épiderme se régénère de la profondeur vers la surface; c'est-à-dire que les cellules basales se divisent et montent vers l'apex pour remplacer les cellules superficielles kératinisées. Il est constitué de quatre couches, ou strates (Fig. 2). La couche basale (stratum basalis), aussi appelée couche germinative, est solidement fixée au derme sous-jacent. Elle est composée d'une seule épaisseur de cellules cuboïdales qui sont les kératinocytes les plus jeunes de la peau. La couche épineuse (stratum spinosum ou couche malpighienne) contient plusieurs strates de cellules qui renferment un réseau de filaments intermédiaires traversant le cytosol

pour se rattacher par des desmosomes (adhésions inter-cellulaires) aux autres cellules environnantes. Ces filaments se composent principalement de faisceaux de kératine. La mince couche granuleuse (stratum granulosum) est constituée de trois à cinq strates dans

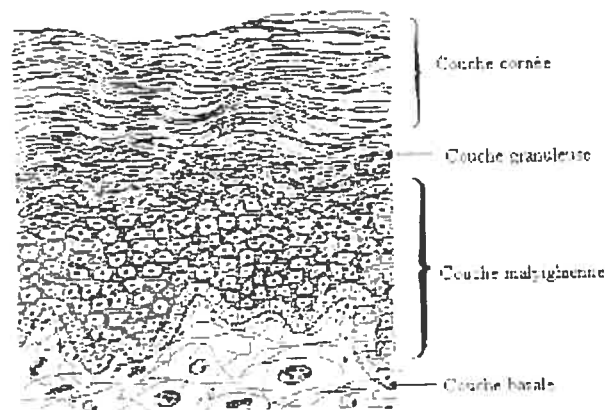


Figure 2. Représentation schématique des quatre couches de l'épiderme. La couche basale est composée de jeunes cellules cuboïdales. La couche malpighienne est formée de plusieurs couches de cellules contenant de la kératine. La mince couche granuleuse comprend quelques couches de cellules qui commencent à se désintégrer. La couche cornée correspond aux strates de cellules mortes. D'après Siméon, 1999.

lesquelles les kératinocytes changent considérablement d'aspect. En effet, ils s'aplatissent et leur noyau ainsi que leurs organelles commencent à se désintégrer. Ils accumulent également des granules de kératohyaline, qui vont favoriser l'accumulation de kératine dans la couche supérieure. Comme l'épiderme puise ses nutriments des capillaires du derme, les cellules épithéliales situées au-delà de la stratum granulosum, étant trop éloignées de ces capillaires pour recevoir une nutrition adéquate, meurent. La couche cornée (stratum corneum) est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle est composée de vingt à trente strates de cellules mortes entièrement remplies de fibrilles de kératine, et elle protège la peau contre l'abrasion et la pénétration (Marieb, 1999). Les cellules de la couche cornée perdent leurs desmosomes et peuvent alors se desquamer individuellement.

L'épiderme est fréquemment exposé à des traumatismes physiques et chimiques. S'il se produit un dommage au niveau de cette structure, cela favorise de nombreuses complications, comme une infection bactérienne ou une perte de fluide. La plaie doit donc guérir le plus vite possible. Deux mécanismes assurent la fermeture de la plaie. En quelques minutes, un caillot sanguin est formé afin de rétablir temporairement une barrière, alors qu'après 24 à 48 heures, il se produit un mouvement de cellules épithéliales résiduelles sous ce caillot (Clark, 1996). Afin de couvrir une surface dénudée, les cellules épithéliales (kératinocytes) doivent migrer ou proliférer à travers la plaie. Ces deux processus sont stimulés par une lésion, cependant, pour qu'il y ait une fermeture plus rapide, la migration domine et se produit indépendamment de la division cellulaire. La vitesse de fermeture de la plaie dépend de l'espèce animale, de la localisation, du substrat et de la taille de la plaie. En général, la vitesse de réépithélialisation augmente si la plaie n'est que superficielle et que la membrane basale est intacte, et si l'environnement de la plaie est gardé humide par une membrane occlusive ou semi-perméable (Svensjö et coll., 2000).

Les cellules migrantes proviennent de l'épithélium résiduel situé en périphérie de la plaie ou des annexes cutanées situées à la base de la plaie. Ce sont les cellules basales qui débutent la migration, après avoir subi des changements phénotypiques marqués (Clark, 1996). Comme ils commencent à migrer à travers la plaie, ils deviennent plats et allongés. Afin de se déplacer sur le substrat, les kératinocytes envoient des projections

cytoplasmiques contenant des filaments d'actine. Leurs tonofilaments (filaments cytoplasmiques insérés dans des desmosomes) et leurs hémidesmosomes sont rétractés vers une localisation périnucléaire. Il se produit également une dissolution des desmosomes. Les cellules épithéliales perdent ainsi leurs liaisons intercellulaires et leur attachement au substrat, ce qui leur confère une mobilité latérale. De plus, les kératinocytes situés au front migratoire deviennent hautement phagocytaires. Ainsi, ils peuvent ingérer le caillot et les débris situés sur leur chemin, accélérant alors leur migration. Si la membrane basale est détruite par une lésion, les cellules épithéliales migrent sur une matrice provisoire composée de collagène de type I et V, de fibrine, de fibronectine, de tenascine et de vitronectine (Clark, 1996). La fibrine et la fibronectine proviennent d'abord de la circulation, puis après quelques jours, des macrophages et des fibroblastes. La route migratoire des cellules épithéliales semble déterminée par une multitude de récepteurs à intégrine exprimés à la surface cellulaire. En fait, la présence de nouvelles protéines de la MEC durant les premiers stades de la guérison joue un rôle majeur dans la migration des cellules épithéliales, puisqu'elle provoque l'augmentation de l'expression d'intégrines (Walt et Jones, 1993). En effet, le récepteur $\alpha 3 \beta 1$ (récepteur de la laminine 5) est important pour le processus de migration cellulaire, car tout comme les récepteurs $\alpha v \beta 5$ (récepteur de la vitronectine), $\alpha v \beta 6$ (récepteur pour la tenascine) et $\alpha 5 \beta 1$ (récepteur pour la fibronectine), il promouvoit l'interaction des cellules avec le substrat (Chettibi et Ferguson, 1999).

La dégradation de la MEC est nécessaire pour que les cellules épithéliales puissent migrer. Elle dépend de la production de collagénase et PA par les cellules épithéliales. Le PA peut également activer la collagénase, facilitant ainsi la dégradation du collagène et des protéines de la MEC (Singer et Clark, 1999).

Les cellules contenues dans l'environnement de la plaie (plaquettes, monocytes, macrophages, cellules endothéliales et épithéliales) relâchent des cytokines et des facteurs de croissance qui influencent la migration, la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Ces médiateurs incluent l'IL-1, l'EGF, le TGF- α et le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) (Werner et coll., 1994). Quant à lui, le TGF- β_1 augmente la synthèse *in vitro* des récepteurs à intégrines ($\alpha 3 \beta 1$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$ et $\alpha 5 \beta 1$), favorisant ainsi la migration des cellules épithéliales. Par contre, ce même facteur de

croissance inhibe leur prolifération et favorise leur différenciation (Moulin et coll., 2000). Une fois que la plaie est couverte par les cellules épithéliales, la laminine est à nouveau exprimée dans la MEC, où elle sert de facteur d'adhésion principal pour ces cellules. La laminine ancre donc les cellules épithéliales au substrat, inhibant une migration continue.

La migration initiale ne nécessite pas de prolifération des cellules épithéliales. Cependant, une fois la migration entamée, une prolifération épithéliale débute en marge de la plaie pour procurer davantage de cellules. Ces nouvelles cellules participent soit à la fermeture de la plaie en se joignant aux autres cellules, soit à la restauration d'un épiderme stratifié.

Suite à l'arrêt migratoire, la matrice provisoire disparaît et est remplacée par une membrane basale mature, si cette dernière a été détruite lors de la lésion. Les protéines de la membrane basale (ex: fibronectine, collagène et laminine) réapparaissent selon une séquence très ordonnée, de la marge de la plaie vers l'intérieur (Clark et coll., 1983). Les cellules épithéliales reprennent leur phénotype normal et se rattachent fermement à la membrane basale restaurée par l'entremise d'hémidesmosomes, et au derme sous-jacent par des fibrilles de collagène de type VII (Gibson et coll., 1988).

Ces processus de restratification et d'ancrage se produisent sur une très longue période, ce qui explique la fragilité du néoépiderme longtemps après une réparation apparemment complète de la plaie.

2.1.3.2 Cellules endothéliales (angiogénèse)

L'appellation ``tissu de granulation`` dérive de l'apparence granulaire du tissu nouvellement formé lors de la phase proliférative de la guérison de plaie. Cette apparence résulte de la présence de nombreux capillaires. À part ces nouveaux vaisseaux sanguins, le tissu de granulation est composé de macrophages, de fibroblastes et de tissu conjonctif lâche. La principale cellule impliquée dans le processus d'angiogénèse (formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants) est la cellule endothéliale microvasculaire, qui diffère des cellules endothéliales formant les

gros vaisseaux sanguins. Suite à une lésion, les cellules endothéliales microvasculaires initient un processus angiogénique (Fig. 3), qui est également modulé par la MEC existante et nouvellement synthétisée, ainsi que par des facteurs solubles. Ce processus comprend une rupture de la liaison entre les cellules endothéliales et leur membrane basale, une migration et une prolifération des cellules dans le stroma interstitiel local, une formation de nouveaux vaisseaux ainsi que leur stabilisation, et éventuellement une involution de ce lit vasculaire nouvellement formé, sans que les vaisseaux pré-existants ne soient affectés. L'angiogénèse est nécessaire pour soutenir le tissu de granulation nouvellement formé, puisque les vaisseaux sanguins vont assurer le transport des nutriments et de l'oxygène nécessaires au métabolisme cellulaire.

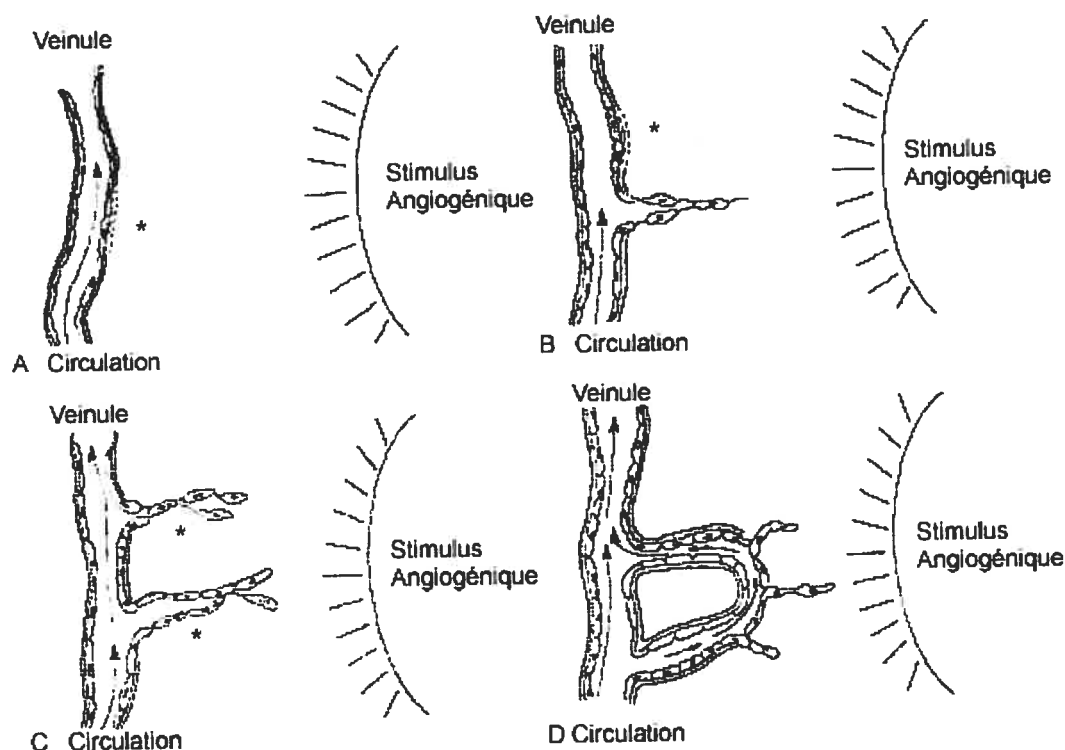


Figure 3. Étapes de l'angiogénèse. *A*, La membrane basale est dégradée par les cellules endothéliales activées (*). *B*, Les cellules endothéliales migrent vers le stimulus angiogénique. La membrane basale d'un autre site commence à se dégrader (*). *C*, Du front de migration, les cellules endothéliales se divisent (*) et forment une lumière. *D*, La circulation est établie à travers le nouveau vaisseau et la membrane basale se dépose durant la maturation de la boucle. D'après Whalen et Zetter, 1992.

La destruction tissulaire lors d'un trauma mène à une hypoxie régionale, suivie par la relâche de médiateurs inflammatoires par les cellules activées, particulièrement les plaquettes et les macrophages. Certains de ces médiateurs, comme le bFGF et le VEGF sont des facteurs angiogéniques spécifiques.

D'autres facteurs de croissance (ex: TGF- β , EGF et PDGF), ainsi qu'une faible pression partielle d'oxygène et l'accumulation d'acide lactique, possèdent une activité angiogénique indirecte via la stimulation de la production de bFGF et de VEGF par les macrophages et les cellules endothéliales (Singer et Clark, 1999). Lorsqu'un stimulus angiogénique favorise la migration des cellules endothéliales, celles-ci doivent d'abord être activées par le bFGF, le TGF- β , l'IL-1, le TNF ou le VEGF afin de sécréter des protéinases qui vont digérer les composantes de la membrane basale (Joseph et coll., 1996). Ces protéinases incluent les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) et le PA de type urokinase (u-PA) (Conway et coll., 2001). Un contrôle étroit de la protéolyse est nécessaire afin d'assurer la progression de l'angiogénèse ainsi que le développement et la maturation des nouveaux capillaires. À cette fin, des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) de la matrice et un inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) sont exprimés en association avec les protéinases.

Une fois qu'elles sont libérées de leurs attaches au substrat, les cellules endothéliales peuvent commencer leur migration. Le bFGF a été associé à des changements dans le phénotype migratoire des cellules endothéliales et à une induction de l'u-PA, favorisant ainsi une stimulation de la migration cellulaire (Joseph et coll., 1996). Le VEGF stimule également la migration des cellules endothéliales (Conway et coll., 2001). Par contre, le TGF- β_1 , qui inhibe la production de u-PA par les cellules endothéliales et augmente les niveaux de PAI-1, a été associé à une inhibition de la migration (Joseph et coll., 1996).

La migration des cellules endothéliales dépend également de la composition et de l'organisation de la MEC, ainsi que des interactions cellulaires avec cette matrice. En effet, les cellules endothéliales situées au front de migration expriment à leur surface le récepteur à intégrines $\alpha v \beta 3$. Seul ce dernier est capable de reconnaître toutes les protéines de la MEC, incluant la fibrine, la fibronectine et la vitronectine, médiant ainsi l'attache des cellules endothéliales à ces composantes (Tonnesen et al, 2000). Le

récepteur $\alpha v\beta 3$ semble médier la migration des cellules endothéliales *in vitro*. Il pourrait donc être critique pour l'angiogénèse *in vivo*, tel que durant la réparation de plaie. La migration des cellules microvasculaires semble également être régulée, en partie, par les interactions entre les cellules. En effet, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion, comme PECAM-1. Normalement, PECAM-1 est distribué aux surfaces latérales des cellules endothéliales, soit au niveau des contacts intercellulaires. Mais lorsque la migration des cellules endothéliales est induite, PECAM-1 est plutôt distribué uniformément sur toute la surface cellulaire, suggérant que cette molécule d'adhésion joue un rôle comme régulateur migratoire (Joseph et coll., 1996).

Les cellules qui demeurent dans le vaisseau original commencent à proliférer, assurant ainsi une source continue de cellules pour l'angiogénèse. Le stimulus prolifératif est très semblable au stimulus migratoire. En effet, le bFGF, le VEGF, le EGF, le TGF- $\beta 1$, le MCP-1 et le PDGF stimulent tous la prolifération endothéliale (Conway et coll., 2001), alors que celle-ci est inhibée par l'IL-1 et le TNF- α (Norioka et coll., 1992).

La formation tubulaire durant le processus angiogénique implique des interactions intercellulaires et entre les cellules et la MEC. En effet, les cellules endothéliales microvasculaires doivent se reconnaître les unes les autres afin de former des interactions stables pour constituer un réseau de nouveaux capillaires. PECAM-1 semble jouer un rôle dans la médiation des premiers contacts entre les cellules endothéliales durant la formation du tube. La formation de la lumière du tube dépend de la protéolyse induite par le bFGF, alors que l'anti-protéolyse induite par le TGF- β contrôle le diamètre des vaisseaux nouvellement formés (Pepper et Montesano, 1990). Par la suite, les capillaires doivent être stabilisés par la synthèse d'une nouvelle membrane basale afin de devenir fonctionnels. Cette synthèse est assurée par les cellules endothéliales et stimulée par le TGF- $\beta 1$ (Pepper et Montesano, 1990).

Une fois que la matrice provisoire est remplacée par un tissu cicatriciel riche en collagène (voir 2.1.3.3), l'angiogénèse cesse et la plupart des capillaires nouvellement formés subissent une involution par apoptose des cellules endothéliales. Cette mort cellulaire programmée est probablement régulée par plusieurs molécules de la matrice,

comme la thrombospondine (TSP) 1 et 2 et des facteurs anti-angiogéniques, comme l'angiostatine, l'endostatine et l'angiopoïétine (Singer et Clark, 1999).

2.1.3.3 Fibroblastes (fibroplasie)

Le nouveau stroma, ou tissu de granulation, commence à se former environ quatre jours suite à un trauma. Les fibroblastes sont responsables de sa synthèse, d'où l'appellation fibroplasie. Les macrophages, les fibroblastes et les vaisseaux sanguins migrent ensemble dans la plaie. Les macrophages procurent une source continue de cytokines nécessaires pour stimuler la fibroplasie et l'angiogénèse, les fibroblastes élaborent la nouvelle MEC nécessaire au soutien de la croissance cellulaire, et les vaisseaux sanguins transportent les nutriments et l'oxygène nécessaires au métabolisme cellulaire.

Les macrophages, les plaquettes et même les fibroblastes relâchent des cytokines et des facteurs de croissance stimulant la chimiotaxie des fibroblastes de façon paracrine ou autocrine; le PDGF, le bFGF et particulièrement le TGF- β semblent être les plus influents. Les molécules structurales de la MEC immature contribuent également à la formation du tissu de granulation en procurant une charpente pour les guides de contacts (fibronectine et collagène), une faible résistance pour la mobilité cellulaire (via l'hyaluronane) et un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance (Clark, 1996). De plus, il existe une réciprocité entre les fibroblastes et la MEC adjacente. En effet, les fibroblastes affectent cette matrice au niveau de sa nouvelle synthèse, son dépôt et son remodelage, alors que la matrice régule plusieurs fonctions des fibroblastes, incluant leur capacité à synthétiser, déposer et remodeler la MEC.

Les fibroblastes se déplacent vers un gradient chimiotactique en étendant des lamellipodes, contenant des filaments d'actine, vers le stimulus, alors que leur pôle opposé reste fermement attaché jusqu'à ce qu'il soit libéré. Ce processus est semblable à l'haptotaxie, où les fibroblastes se déplacent en étendant des lamellipodes de façon randomisée. Chaque protrusion compétitionne alors pour une surface membranaire et lorsqu'un des lamellipodes devient dominant, la cellule se dirige dans cette direction et

le processus recommence. Même en l'absence d'un gradient d'adhésion, les fibrilles de la MEC influencent la direction de la migration fibroblastique, puisqu'elles s'alignent le long des discontinuités dans le substrat auquel elles sont attachées. C'est ce qu'on appelle les guides de contact (Clark, 1996).

Pour atteindre le centre de la plaie, les fibroblastes doivent d'abord passer à travers le caillot de fibrine, ce qui nécessite un système protéolytique actif. Les candidats potentiels assurant la dégradation de la fibrine incluent le PA, la collagénase interstitielle (MMP-1), la gélatinase (MMP-2) et la stromelysine (MMP-3). Certains facteurs chimiotactiques, comme le PDGF et le TGF- β , stimulent la production et la sécrétion de ces protéinases lors de la fibroplasie (Vaalamo et coll., 1997), même si durant le remodelage tissulaire, le TGF- β va plutôt les inhiber afin de favoriser l'accumulation des composantes de la MEC.

Durant la phase inflammatoire, la dégranulation plaquettaire induit dans la plaie la relâche de grandes quantités de PDGF, de TGF- β , de EGF, de IGF-I, de TNF- α , de bFGF et du facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF). Toutes ces cytokines, ou facteurs de croissance, sont de puissants mitogènes pour les fibroblastes (Clark, 1996). Cinq à sept jours suivant un trauma, les fibroblastes commencent à migrer dans la plaie sous l'influence des facteurs chimiotactiques énumérés précédemment. Cette activité précède la migration des cellules endothéliales, mais suit l'arrivée des macrophages, qui ont ouvert une voie en phagocytant les débris cellulaires et tissulaires.

Une fois dans la plaie, les fibroblastes vont graduellement échanger leur phénotype migratoire pour un phénotype synthétique: leur réticulum endoplasmique et leur appareil de Golgi deviennent plus dispersés à travers le cytoplasme et les fibroblastes commencent à déposer une MEC lâche provisoire composée de grandes quantités de fibronectine, qu'ils utilisent comme charpente pour se déplacer dans la plaie (Clark, 1996). En effet, ces cellules se lient d'abord à la matrice de fibronectine par l'intermédiaire de β_1 intégrines et ensuite les unes aux autres par l'intermédiaire de β_2 intégrines. L'IL-1, le EGF, le TNF- α , le PDGF, IGF-I et les TGF- β_1 et - β_2 stimulent ce dépôt de MEC par les fibroblastes. Cette matrice est principalement composée de fibronectine et de glycosaminoglycanes (ex: hyaluronane). La plupart des médiateurs favorisant cette synthèse entraînent une augmentation de l'activité synthétique des

fibroblastes via l'induction de l'activité du TGF- β . Ultimement, la matrice provisoire est remplacée par une matrice de collagène, qui résulte de l'action pro-fibrotique du TGF- β_1 . Peu de temps après le dépôt d'une quantité suffisante de collagène, la synthèse de ce dernier cesse, en dépit de l'expression soutenue du TGF- β_1 (Clark, 1996). Le tissu de granulation riche en fibroblastes est alors remplacé par une cicatrice acellulaire, comme certaines cellules subissent l'apoptose alors que d'autres se différencient en myofibroblastes. Cette modulation phénotypique est surtout due au TGF- β_1 , qui stimule l'expression de l' α -actine musculaire lisse (ML) dans les fibroblastes du tissu de granulation (Clark, 1996). En contrepartie, les IFNs (particulièrement l'IFN- γ) diminuent l'expression de cette protéine contractile, inhibent la contraction *in vitro*, inhibent la prolifération cellulaire, suppriment la synthèse de collagène et augmentent la production de collagénase. Ces dernières cytokines sont donc de bonnes candidates pour exercer des activités anti-fibrotiques *in vivo*.

2.1.3.4 Myofibroblastes (contraction)

Durant la deuxième semaine de réparation, les bords de la plaie sont progressivement rapprochés par la contraction du tissu de granulation, phénomène important pour réduire la taille de la plaie. Cette contraction est assumée par les myofibroblastes (Gabbiani et coll., 1971). Ces cellules riches en actine combinent les caractéristiques ultrastructurales des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. À cette phase de la guérison, les myofibroblastes forment l'élément cellulaire le plus abondant du tissu de granulation, où ils sont alignés le long des lignes de contraction, contrairement aux macrophages et aux capillaires qui sont plutôt désorganisés. La caractéristique la plus frappante du myofibroblaste est que son cytoplasme contient un système de microfilaments d' α -actine ML bien développé contenant des corps denses et disposé parallèlement à l'axe de la cellule. Les myofibroblastes possèdent également un réticulum endoplasmique rugueux abondant et leur noyau présente des invaginations caractéristiques d'une activité contractile. Les myofibroblastes sont interconnectés par des jonctions gap et des hémidesmosomes, ce qui permet à une cellule d'exercer une

tension sur sa voisine. De plus, ils sont connectés à la MEC par des structures appelées fibronexus. Ces derniers sont des complexes transmembranaires de microfilaments intercellulaires d'actine, en apparente continuité avec les fibres de fibronectine et de collagène extracellulaires (Singer, 1979). Il a été postulé que ces interconnexions participent à la transmission de la contraction cellulaire aux autres composantes tissulaires.

Le nombre de myofibroblastes dans la plaie semble proportionnel aux besoins de contraction. Ce type cellulaire provient possiblement d'une différenciation de fibroblastes du tissu adjacent, mais peut également provenir de cellules ML locales ou de péricytes. Il est probable que la contraction requiert une stimulation par des facteurs de croissance. Ceux-ci restent toutefois inconnus, même si le TGF- β_1 fût associé à une régulation positive de l'expression de l' α -actine ML dans les fibroblastes du tissu de granulation chez le rat (Desmouliere et coll., 1993), alors que le PDGF fût identifié comme stimulant majeur de la contraction d'un gel de collagène par des fibroblastes *in vitro* (Clark et coll., 1989). En plus de favoriser la contraction, le TGF- β_1 a été associé à une augmentation de la synthèse de collagène par les myofibroblastes, augmentant ainsi la fibrose (Moulin et coll., 1998).

La contraction de la plaie nécessite également l'attachement des fibroblastes à la matrice de collagène par l'intermédiaire d'intégrines (récepteur $\alpha_2\beta_1$) (Schirow et coll., 1991) et par des enchevêtrements intermoléculaires entre les faisceaux de collagène individuels (Woodley et coll., 1991).

Lorsque la contraction cesse et que la plaie est complètement réépithélialisée, les myofibroblastes disparaissent par apoptose, ce qui permet au tissu de granulation d'évoluer en une cicatrice acellulaire (Desmouliere et coll., 1995). Notamment, les myofibroblastes persistent dans les cicatrices hypertrophiques (Ehrlich et coll., 1994) et dans d'autres lésions fibrotiques, où ils seraient impliqués dans le phénomène rétractile aussi bien que dans l'accumulation de MEC. À ce niveau, l'IFN- γ exerce une activité anti-fibrotique en diminuant entre autre l'expression d' α -actine ML dans les myofibroblastes (Desmouliere et coll., 1993).

Enfin, il est important de ne pas confondre la contraction avec la contracture, ce dernier phénomène résultant en une réduction pathologique d'un tissu cicatriciel. Ceci

mène à une difformité et est opposé à la contraction qui se produit dans les plaies ouvertes afin de réduire positivement la surface de la plaie à être réépithélialisée.

2.1.4 Synthèse et remodelage tissulaire

La dernière phase de réparation implique la formation et le remodelage de la MEC par le remplacement des composantes de la matrice provisoire. La formation de cette dernière survient lors de la phase proliférative, alors que le tissu de granulation envahit la plaie. Toutefois, la composition de la MEC est continuellement modifiée par la suite. La matrice est déposée de la périphérie vers le centre de la plaie, concurremment avec le tissu de granulation.

2.1.4.1 Fibronectine

Lors de la fibroplasie, la fibronectine et l'hyaluronane sont présents en très grandes quantités. La fibronectine procure un substrat provisoire pour la migration et la croissance des cellules du tissu conjonctif, forme une portion des fibronexi permettant aux myofibroblastes d'effectuer la contraction de la plaie, module la croissance cellulaire et l'expression génique et sert de modèle pour la fibrillogénèse du collagène de type III, puis pour celle du collagène de type I (Clark, 1996). Le EGF, le PDGF et le TGF- β_1 stimulent le dépôt de fibronectine par les fibroblastes. Cependant, ce dépôt serait contrôlé par la matrice adjacente, ce qui permettrait de limiter la production de fibronectine une fois la matrice provisoire établie. Lors du processus de remodelage, l'élimination de la fibronectine est accomplie par la sécrétion de protéinases dans la plaie. Le système PA-plasmine est le premier à agir, suivi de certaines MMPs activées par la plasmine.

2.1.4.2 Hyaluronane

L'hyaluronane est un glycosaminoglycane non-sulfaté qui constitue une composante majeure du jeune tissu de granulation. Dans les plaies cutanées ouvertes, le

contenu en hyaluronane augmente durant les quatre premiers jours de la guérison, chute entre le cinquième et le dixième jour et reste constant par la suite (Bentley, 1967). L'hyaluronane promeut le mouvement cellulaire dans le jeune tissu de granulation. Le mouvement est facilité soit par le bris d'adhésion entre la membrane cellulaire et la matrice, soit par la création d'espaces migratoires entre les fibres de collagène ou les cellules grâce à la structure moléculaire hautement hydratée de l'hyaluronane qui favorise un gonflement des tissus (Toole, 1981). L'hyaluronane peut également se lier avec une grande affinité à la fibronectine, empêchant celle-ci d'interagir avec l'héparane sulfate, un protéoglycane de la surface cellulaire qui assure normalement l'attachement au substrat (Clark, 1996). Lors de la maturation du tissu de granulation, le niveau d'hyaluronane diminue par l'action de l'hyaluronidase tissulaire (Bertolami et Donoff, 1982). Des protéoglycanes remplaceront éventuellement l'hyaluronane, assurant une plus grande résistance à la plaie.

2.1.4.3 Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des molécules composées d'un noyau protéique auquel au moins une chaîne latérale de glycosaminoglycane est liée de façon covalente. Il existe deux classes principales de ces glycosaminoglycanes: les galactosamines (ex: chondroïtine sulfate) et les glucosamines (ex: héparane sulfate et dermatane sulfate). Ce sont des molécules largement répandues dans les tissus conjonctifs, incluant les membranes basales, et elles sont en association étroite avec la surface cellulaire. Contrairement à l'hyaluronane, les niveaux de chondroïtine-4-sulfate et de dermatane sulfate augmentent durant la deuxième semaine de réparation (Bentley, 1967). Comme mentionné précédemment, les protéoglycanes confèrent une meilleure résistance aux tissus. Cependant, plusieurs autres hypothèses existent au sujet du rôle des protéoglycanes. En effet, puisque l'hyaluronane favorise le mouvement cellulaire en inhibant l'adhésion de la fibronectine à l'héparane sulfate, on peut supposer que lorsque ce dernier commence à augmenter dans la MEC, il agit comme un récepteur de surface

pour la fibronectine, favorisant donc l'adhésion au substrat. L'héparane sulfate pourrait également jouer un rôle dans l'angiogénèse. Comme la MEC mature et que la proportion de protéoglycanes augmente, des phénotypes cellulaires différenciés réapparaissent. Ces cellules sont maintenant capables de synthétiser la matrice. Par conséquent, la production de protéoglycanes augmente et les membranes basales sont remodelées. D'ailleurs, la chondroïtine-4-sulfate accélère la polymérisation des monomères de collagène *in vitro* (Wood, 1960), facilitant donc la fibrillogénèse du collagène durant la formation et le remodelage de la MEC.

2.1.4.4 Collagène

Dans la MEC, le dépôt du collagène de type III (immature) précède d'environ cinq jours celui du collagène de type I (mature). Les macromolécules de collagène agrégées en fibrilles procurent une force élastique aux tissus de la plaie, alors que leur dépôt est maximal entre sept et quatorze jours. La plaie ne retrouve que 20% de sa force finale durant les trois premières semaines, durant lesquelles les fibrilles de collagène sont accumulées relativement rapidement et sont remodelées par la contraction de la plaie (Singer et Clark, 1999). Ensuite, la synthèse de collagène doit absolument être balancée par sa dégradation pour éviter qu'il n'y ait une accumulation excessive de tissu fibreux (fibrose). La force tensile continue d'augmenter lentement durant quelques mois, reflétant un plus faible taux d'accumulation du collagène, un remodelage conduisant à la formation de gros faisceaux de collagène, et une augmentation du nombre d'enchevêtrements intermoléculaires dans la cicatrice mature. Cependant, jamais une plaie cutanée ne retrouvera la force de la peau intacte. En effet, la force maximale d'une cicatrice est de 15 à 20% plus faible que le tissu normal adjacent (Levenson et coll., 1965).

Durant le remodelage de la MEC, le catabolisme du collagène est assuré par diverses collagénases (MMPs) relâchées par les macrophages, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Le TNF- α , le EGF, le PDGF, et les IFNs sont capables de stimuler la synthèse de collagénases par les fibroblastes. À l'opposé, le

TGF- β inhibe la production de MMPs et stimule l'expression des TIMPs, favorisant donc une accumulation des composantes de la MEC.

2.2 TGF- β

Le TGF- β est généralement reconnu comme étant le facteur de croissance ayant le plus grand champ d'activités dans la réparation des tissus lésés. Le TGF- β est un membre d'une super famille de polypeptides qui inclut les isoformes TGF β_1 à $-\beta_5$, les protéines morphogéniques de l'os (BMPs), les activines et les inhibines. Parmi les cinq types de TGF- β connus à ce jour, trois seulement (TGF- β_1 , TGF- β_2 et TGF- β_3) sont exprimés chez les mammifères. TGF- β_1 est le plus abondant dans tous les tissus, et la seule forme retrouvée dans les plaquettes humaines. Bien que des différences fonctionnelles subtiles existent dans la structure primaire de ces trois isoformes, ils partagent tout de même un grand nombre de fonctions. *In vitro*, les trois protéines ont des effets semblables, alors que *in vivo*, en dépit de leur grande homologie (60 à 80%), leur distribution temporelle et spatiale est spécifique. Jusqu'à tout récemment, le TGF- β_1 , le TGF- β_2 et le TGF- β_3 n'étaient pas identifiés comme des entités séparées et distinctes, et la littérature réfère souvent à une protéine TGF- β de type générique. Par conséquent, je vais ici respecter la nomenclature utilisée dans la littérature, même si celle-ci est parfois techniquement incorrecte.

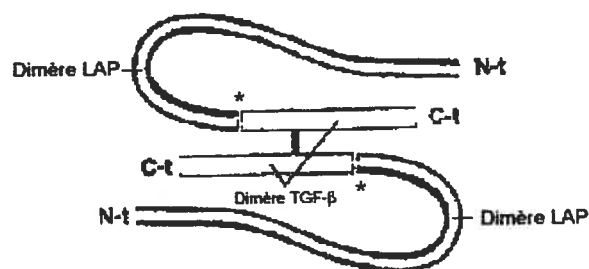
2.2.1 Structure moléculaire

Le TGF- β humain est un homodimère non-glycosylé de 25 kDa formé de deux chaînes identiques de 112 acides aminés reliées par un pont disulfure (Attisano et coll., 1994). Cette protéine est produite par la majorité des cellules sous la forme d'un complexe latent incapable de s'associer avec son récepteur de signallement (Fig. 4). Le TGF- β_1 libre dans le plasma a une demi-vie d'environ deux minutes, alors que la protéine latente a une demi-vie de 90 minutes (Lawrence, 1996). Cela suggère qu'une

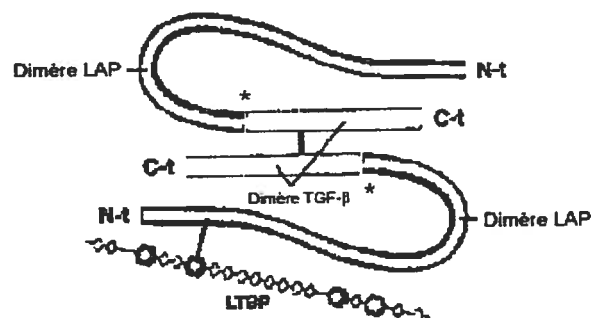
des fonctions de la latence est d'assurer une stabilité en même temps qu'une source de TGF- β_1 disponible localement. Le complexe latent est un dimère contenant le TGF- β mature à son extrémité C-terminale et un pro-domaine à son extrémité N-terminale (Gentry et coll., 1988; Lawrence et coll., 1984). Puisque ce pro-domaine est suffisant pour procurer la latence, il est surnommé protéine associée à la latence, ou LAP. Le LAP contient des groupements mannose-6-phosphate et est associé au dimère par des interactions non-covalentes, formant ainsi le petit complexe latent. Le gros complexe latent contient, en plus du dimère, une protéine de liaison du TGF- β latent (LTBP) liée de façon covalente au LAP. La LTBP ne confère pas de latence, mais elle est nécessaire à la sécrétion efficace du complexe.

Cela explique pourquoi la majorité des cellules sécrètent le TGF- β sous la forme d'un gros complexe latent (Miyanoso et coll., 1991).

L' α_2 -macroglobuline (α_2 -M) humaine est une importante protéine plasmatique qui agit comme inhibiteur de protéinases à large spectre. Elle est synthétisée par de nombreux types cellulaires, et en particulier par les hépatocytes, les macrophages et les cellules corticosurréaliennes. Le TGF- β forme rapidement un complexe latent réversible avec l' α_2 -M, qui se transforme lentement en un complexe covalent irréversible. La forme non-



a) Petit complexe latent



b) Gros complexe latent

Figure 4. Représentation schématique du petit (a) et du gros (b) complexe latent. Les lignes solides courtes représentent les ponts disulfures. Les sites de clivage sont représentés par un astérisque (*). En b, seul un des deux monomères de LAP est lié de façon covalente au LTBP. D'après Lawrence, 2001.

covalente peut être dissociée par l'héparine, qui libère ainsi du TGF- β actif *in situ*. Ce complexe non-covalent peut donc servir de moyen de transport et de mécanisme de neutralisation pour le TGF- β , alors que le complexe covalent, qui est le seul à pouvoir se lier au récepteur de l' α_2 -M, peut représenter une forme de clairance du TGF- β (Lawrence, 2001).

2.2.2 Mécanismes d'activation

L'activation du TGF- β latent implique la rupture de l'interaction non-covalente entre le LAP et le TGF- β , ce qui permet à ce dernier de se lier à son récepteur de signallement. Exception faite du complexe covalent α_2 -M-TGF- β , les diverses formes latentes peuvent être activées par l'acidification qui se produit dans le foyer inflammatoire d'une plaie (Lawrence et coll., 1984). Cela suggère fortement que les interactions entre LAP et le TGF- β sont réalisées par des liaisons hydrogènes. L'activation du TGF- β latent par l'action de protéinases (plasmine et cathepsine D) représente un autre mécanisme physiologique d'activation (Harpel et coll., 1992). En effet, la plasmine provoque un changement conformationnel de la molécule LAP, entraînant ainsi le relargage du TGF- β actif. Cependant, ce mode d'activation est plus efficace sur la petite forme latente et est environ 70 % moins efficace que celle qui se produit lors d'acidification (Feige et coll., 1996).

Le processus d'activation protéolytique a lieu dans un compartiment bien défini: la surface cellulaire. En effet, pour qu'il y ait activation, le système protéolytique et le TGF- β doivent tous deux être localisés à la surface cellulaire. Le petit complexe latent peut satisfaire cette contrainte par le biais d'une interaction des groupements mannose-6-phosphate de LAP avec leurs récepteurs (Feige et coll., 1996).

Plusieurs types cellulaires (ex: cellules épithéliales et endothéliales) peuvent activer le TGF- β latent en réponse à des stimulus biologiques. Ceux-ci incluent les rétinoïdes, le bFGF, la lipoprotéine A et la TSP1 (Feige et coll., 1996). La TSP1 est une protéine trimérique sécrétée par les plaquettes qui ont été activées par la thrombine. En l'absence de tout contact cellulaire, la TSP1 semble capable d'activer le petit et le gros complexe latent du TGF- β , mais apparaît sans effet sur les complexes α_2 -M-TGF- β (Souchelnitskiy et coll., 1995).

L'activation du TGF- β latent résulte du changement conformationnel du complexe LAP-TGF- β induit par l'association moléculaire de la TSP1 et de la protéine LAP.

2.2.3 Voie de signallement

Le TGF- β se lie avec haute affinité à une grande variété de types cellulaires. Trois différents récepteurs sont impliqués dans la voie de signallement du TGF- β_1 : le TGF- β -RI, le TGF- β -RII et le TGF- β -RIII (bêtaglycane) (Koli et Arteaga, 1997). RI et RII sont dotés d'une activité sérine-thréonine kinase intrinsèque portée par leur domaine cytoplasmique (Attisano et coll., 1994) et leur expression est généralement co-localisée (Gold et coll., 1997). Le TGF- β activé se lie au domaine extra-cellulaire du TGF- β -RII, ce qui induit une hétérodimérisation RI/RII et une transphosphorylation du domaine intra-cytoplasmique de RI par RII qui conduit à la stimulation de son activité sérine-thréonine kinase (Feige et coll., 1996). Le TGF- β -RI, peut alors reconnaître et phosphoryler les membres d'une famille de médiateurs de signallement intracellulaire, les Smads (Fig. 5) (Attisano et Wrana, 2000).

Trois classes de Smads ont été définies: les récepteurs Smads régulés, ou R-Smads (Smad2 et Smad3), le Co-Smad (Smad4) et les Smads inhibiteurs (Smad6 et Smad7) (Attisano et Wrana, 2000). Les R-Smads sont des substrats directs du TGF- β -RI. La phosphorylation du domaine MH2 d'un R-Smad (Smad2 ou Smad3) par le TGF- β -RI provoque la dissociation du récepteur, stimule l'assemblage d'un complexe hétéromérique entre le R-Smad phosphorylé et Smad4 et induit l'accumulation nucléaire de ce complexe. Dans le noyau, le complexe R-Smad/Co-Smad peut réguler la transcription de gènes spécifiques responsables de la synthèse d'une superfamille de protéines liées au TGF- β (ex : cytokines, protéines matricielles et inhibiteurs de protéinases) par des interactions avec l'ADN et des protéines liant l'ADN, comme ``forkhead activin signal transducer`` (FAST)-1, FAST-2 et Fos/Jun (Chen et coll., 1996, 1997; Liu et coll., 1997; Labbé et coll., 1998; Zhang et coll., 1998; Zhou et coll., 1997).

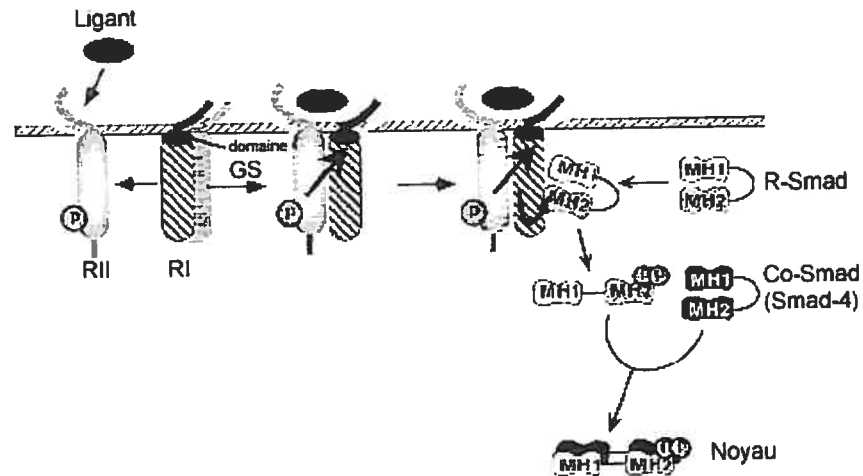


Figure 5. Voie de signalment du TGF- β . Le ligand agit via les récepteurs sérine/thréonine kinase de type I et de type II. La liaison à RII permet le recrutement de RI. Le récepteur II constitutivement actif phosphoryle (P) le récepteur I au niveau d'une région hautement conservée, le domaine GS. RI activé phosphoryle (P) R-Smad, ce qui provoque sa dissociation du complexe récepteur et induit la formation d'un complexe hétéromérique (R-Smad-Smad-4). Ce complexe est ensuite transloqué au noyau afin de réguler l'activation de gènes spécifiques. D'après Attisano et Wrana, 2000.

La phosphorylation de R-Smad par le TGF- β -RI est essentielle pour l'activation de la voie de signalment du TGF- β . Récemment, une protéine nommée SARA (pour ancrage des Smads pour l'activation du récepteur) a été impliquée dans ce processus (Tsukazaki et coll., 1998). SARA, qui co-localise avec le TGF- β -RI se lie spécifiquement à Smad2 et à Smad3 non-phosphorylés et contient un domaine double doigt de zinc (FYVE). Ce domaine permet de recruter R-Smad à un endroit de la membrane cellulaire où le TGF- β -RI actif est localisé. L'activation de la voie de signalment du TGF- β entraîne la dissociation de Smad2 et de SARA et la formation concomitante d'un complexe Smad2/Smad4. La délétion du domaine FYVE provoque une mauvaise localisation de Smad2 et inhibe la réponse transcriptionnelle dépendante du TGF- β (Tsukazaki et coll., 1998).

Smad2 et Smad3 jouent donc un rôle important dans la voie de signallement du TGF- β . Les souris déficientes en Smad3 (souris Smad3^{ex8/ex8}) peuvent survivre jusqu'à l'âge adulte, même si elles ont une fonction immunitaire déficiente (Massagué, 1999), alors que les souris déficientes en Smad2 meurent lors de l'embryogénèse (Ashcroft et coll., 1999). Après la création d'une lésion cutanée, il se produit une guérison accélérée chez les souris Smad3^{ex8/ex8}: les plaies qui prenaient cinq jours à guérir chez la souris de type sauvage n'en prennent plus que deux chez la souris déficiente en Smad3 (Ashcroft et coll., 1999). En fait Smad3 inhibe la réponse des neutrophiles et des monocytes au TGF- β ainsi que la réépithélialisation, en affectant la prolifération des cellules épithéliales (Ashcroft et coll., 1999).

Le bêtaglycane (RIII) joue deux rôles de modulateur de la réponse au TGF- β . Comme protéine associée à la MEC, le bêtaglycane présente, avec une grande affinité, le TGF- β au TGF- β -RII, augmentant ainsi la réponse cellulaire à ce facteur. Cependant, sous forme soluble, le bêtaglycane, tout comme l' α_2 -M, inhibe la liaison du TGF- β à son récepteur membranaire, empêchant ainsi son action (Attisano et coll., 1994).

2.2.4 Expression du TGF- β et de ses récepteurs

Il a été suggéré qu'une régulation positive transitoire de l'expression du TGF- β est importante pour la réparation tissulaire normale (Frank et coll., 1996), alors qu'une mauvaise régulation et une surproduction soutenue de ce facteur de croissance contribuent à la fibrose tissulaire (Border et Noble, 1994). Une augmentation de l'expression de TGF- β_1 a été observée dans les tissus de patients souffrant de fibrose cutanée ou non-cutanée. En effet, une surexpression de TGF- β est liée au développement de cicatrices hypertrophiques et de chéloïdes (Schmid et coll., 1998). Les fibroblastes isolés de cicatrices hypertrophiques montrent une forte réponse au TGF- β comparativement aux cellules provenant d'une peau guérissant normalement (Garner et coll., 1993). Par conséquent, la cicatrisation excessive pourrait être liée à une surexpression de récepteurs pour le TGF- β .

Chez la brebis, les récepteurs I et II co-localisent dans la peau lésée et non-lésée, où ils sont présents sur le même type de cellules que la protéine TGF- β (Gold et coll., 1997). Cependant, les récepteurs n'apparaissent que un à cinq jours après la protéine TGF- β . Dans la peau intacte, les récepteurs sont exprimés à travers les quatre couches de l'épiderme, alors que les fibroblastes, les vaisseaux sanguins et la MEC du derme en sont dépourvus (Gold et coll., 1997). Vingt-quatre heures après l'initiation de la lésion, l'épiderme intact adjacent à la plaie montre une augmentation de l'expression des deux récepteurs, alors qu'un jour plus tard, le nouvel épithélium migratoire en est complètement dénué (Gold et coll., 1997). Les cellules épithéliales qui migrent par-dessus la plaie restent négatives jusqu'à ce que la réépithélialisation soit complète. Un épiderme hyperplasique apparaît vers le cinquième jour après création de la lésion et ses cellules épithéliales expriment les deux types de récepteurs, alors que dans le derme, l'expression des récepteurs augmente en synchronie avec la prolifération cellulaire de la plaie (Gold et coll., 1997).

Dans la peau humaine normale et intacte, l'expression de RI et de RII est visible dans l'épiderme, dans les annexes cutanées et dans les cellules vasculaires, alors que seul un petit nombre de fibroblastes dermiques expriment ces récepteurs (Schmid et coll., 1998). En revanche, les fibroblastes du tissu de granulation provenant de plaies excisionnelles guérissant normalement expriment fortement les deux types de récepteurs pour le TGF- β , mais la densité de ces cellules positives diminue durant le remodelage tissulaire (Schmid et coll., 1998). Cependant, dans les cicatrices hypertrophiques résultant d'une brûlure, on retrouve des fibroblastes surexprimant RI et RII jusqu'à vingt mois après l'initiation du trauma (Schmid et coll., 1998). Ces résultats suggèrent que le processus de réparation de plaie fait appel à une accumulation temporaire d'une sous-population de fibroblastes possédant des capacités accrues de répondre au TGF- β , ce qui pourrait mener à une guérison pathologique si ces fibroblastes modifiés persistent (Schmid et coll., 1998).

2.2.5 Effets biologiques sur la réparation tissulaire

Le TGF- β affecte plusieurs aspects de la réparation tissulaire (Tab. I). Il attire les cellules au site de lésion par chimotaxie, favorise l'angiogénèse ainsi que la contraction et stimule la formation du tissu de granulation et l'accumulation de la MEC.

Table I. *Effets biologiques de la protéine TGF- β sur différents types cellulaires lors de la réparation tissulaire*

CELLULE CIBLE	EFFET
Neutrophile	Chémotaxie
Monocyte	Chémotaxie Autorégulation positive
Macrophage	Stimule phagocytose Désactivation fin de phase inflammatoire -diminution d'expression de RI et RII -désactivation de H_2O_2 et O_2^- Synthèse de facteurs angiogéniques
Fibroblaste	Chémotaxie Activation Stimule synthèse de protéines matricielles Inhibe synthèse de protéinases Stimule synthèse d'inhibiteurs de protéinases
Cellule endothéliale	Synthèse de facteurs angiogéniques Supprime prolifération cellulaire Contrôle diamètre des vaisseaux
Cellule épithéliale	Augmente réépithélialisation
Myofibroblaste	Augmente activité contractile

2.2.5.1 Chémotaxie

Le TGF- β est probablement un des plus puissants stimulateurs de la chémotaxie. Il favorise la migration de monocytes, de lymphocytes, de neutrophiles et de fibroblastes à des concentrations femtomolaires (Wahl et coll., 1987). Dans les modèles de guérison de plaie normale et déficiente, l'application topique de TGF- β_1 augmente la réponse inflammatoire (Mustoe et coll., 1987). Lorsqu'ils s'accumulent dans la lésion, les phagocytes mononucléaires sont stimulés par le TGF- β_1 à phagocyter les substances pathogènes et les débris tissulaires.

Les récepteurs pour le TGF- β apparaissent sur les neutrophiles et les monocytes un à cinq jours plus tard que la protéine (Gold et coll., 1997). Cela implique que le TGF- β peut réguler positivement ses propres récepteurs ou encore reflète un retard dû à l'activation du TGF- β latent. Le TGF- β_1 stimule également la synthèse d'une plus grande quantité de TGF- β ainsi que la production d'autres médiateurs angiogéniques et fibrogéniques, comme l'IL-1, le TNF- α , le PDGF, le EGF et le bFGF, par les monocytes et les macrophages inflammatoires (Wahl et coll., 1987; McCartney-Francis et coll., 1990). Dans ces types cellulaires, il existe donc une boucle de régulation positive pour ce facteur de croissance.

Le TGF- β possède de puissantes propriétés pro-inflammatoires incluant le recrutement (roulement et attachement) et l'adhésion des leucocytes, ainsi que la sécrétion et l'activation de MMPs. Paradoxalement, vers la fin de la phase inflammatoire, le TGF- β change de rôle; d'une cytokine pro-inflammatoire il devient un médiateur de réparation. En fait, lorsqu'un macrophage est activé, il altère l'expression et l'affinité de ses récepteurs pour le TGF- β et devient susceptible à une suppression médiée par le TGF- β (Bogdan et Nathan, 1993). Ce phénomène pourrait être essentiel à la résolution de l'inflammation. D'ailleurs, les souris incapables de produire du TGF- β_1 sont aussi incapables de renverser la réponse inflammatoire suscitée par un trauma (Kulkarni et coll., 1993). En désactivant les macrophages, le TGF- β prépare le site pour le recrutement et la prolifération des fibroblastes ainsi que pour la synthèse et le remodelage de la MEC.

2.2.5.2 Angiogénèse

Le TGF- β et ses récepteurs apparaissent progressivement sur l'endothélium des vaisseaux sanguins alors que l'angiogénèse augmente dans le lit de la plaie (Gold et coll., 1997). Le TGF- β induit indirectement l'angiogénèse dans le tissu de granulation en favorisant la synthèse de facteurs angiogéniques comme le bFGF et le VEGF par les cellules endothéliales et les macrophages (Singer et Clark, 1999). Une fois que ces facteurs sont dissipés, le TGF- β supprime la prolifération des cellules endothéliales et contrôle le diamètre des vaisseaux sanguins nouvellement formés, via une activité anti-protéolytique (Pepper et Montesano, 1990). Ces effets permettent de coordonner la vascularisation pour que la réparation puisse procéder normalement.

2.2.5.3 Synthèse du tissu de granulation

Les effets du TGF- β sur la MEC sont plus complexes et prépondérants que ceux de n'importe quel autre facteur de croissance. Le TGF- β est essentiel à la maturation et à l'augmentation de la résistance d'une plaie. Une fois que les fibroblastes dermiques ont migré dans la plaie en réponse à de faibles concentrations de TGF- β_1 , ils sont activés transcriptionnellement par de grandes concentrations de cette protéine. Le TGF- β_1 régule la transcription d'une grande variété de protéines de la MEC incluant la fibronectine, la tenascine, la TSP1, les glycosaminoglycane, le collagène, les MMPs, les TIMPs et les récepteurs intégrine (Roberts et Sporn, 1996). L'effet net du TGF- β durant la phase proliférative de la guérison est une augmentation de la production des composantes de la MEC ainsi qu'une diminution de leur protéolyse, ce qui conduit à l'augmentation de la résistance de la plaie et possiblement de la fibrose. D'ailleurs, l'injection d'anticorps neutralisant le TGF- β en bordure d'une plaie dermique chez le rat adulte permet une guérison sans qu'il y ait formation d'une cicatrice (Shah et coll., 1992).

Il semble que le TGF- β_1 et le TGF- β_2 jouent un rôle semblable dans la régulation de la fibrose, alors que, malgré qu'il existe des controverses, le TGF- β_3 semble exercer plusieurs effets anti-fibrotiques (Roberts et Sporn, 1996). En effet, chez le rat normal, le

TGF- β_3 a un effet anti-inflammatoire et un apport exogène conduit à une diminution de la cicatrisation par le biais d'une réduction du dépôt de MEC. Cet effet est médié en partie par l'antagonisme du TGF- β_3 sur l'action du TGF- β_1 et du TGF- β_2 (Shah et coll., 1995).

2.2.5.4 Réépithélialisation

Le TGF- β_1 joue probablement un rôle dans la réépithélialisation *in vivo* (Gold et coll., 1997). Même s'il inhibe la prolifération des cellules épithéliales *in vitro*, plusieurs études *in vivo* ont démontré que le TGF- β_1 accélère la réépithélialisation lorsqu'il est utilisé à une dose appropriée, par le biais de l'induction de la production de fibronectine et de l'expression de ses récepteurs cellulaires (Roberts et Sporn, 1996). Cependant, la dose appropriée dépend entre autre du modèle animal.

Les cellules épithéliales sont capables de réguler négativement la synthèse de TGF- β_1 par les fibroblastes *in vitro* (Le Poole et Boyce, 1999). Donc, une fois que la réépithélialisation est commencée, l'influence du TGF- β_1 sur la phase proliférative diminue, ce qui préviendra une fibrose excessive de la plaie. En contrepartie, les plaies qui montrent une réépithélialisation retardée ou absente maintiennent un niveau élevé de TGF- β_1 , qui peut alors favoriser une fibrose excessive et une cicatrisation pathologique.

2.2.5.5 Contraction

Le TGF- β_1 augmente grandement l'activité contractile *in vitro* des fibroblastes enchâssés dans un gel de collagène (Montesano et Orci, 1988) et induit l'expression d' α -actine ML dans les myofibroblastes du tissu de granulation et dans les fibroblastes latents et croissant en culture (Desmouliere et coll., 1993; Serini et Gabbiani, 1996). Par contre, il a été démontré qu'*in vivo*, l'isoforme TGF- β_3 agit comme régulateur négatif du phénotype myofibroblastique (Serini et Gabbiani, 1996).

2.2.5.6 Cicatrisation

La formation d'un tissu cicatriciel représente un problème clinique significatif, puisqu'elle peut résulter en une perte de fonction et une défiguration. Les plaies dermiques fœtales guérissent sans cicatrice; chez le fœtus, la guérison est un processus régénérateur plutôt que réparateur (Roberts et Sporn, 1996). Plusieurs différences existent entre les plaies fœtales et les plaies adultes: les plaies fœtales n'impliquent pas la formation d'un caillot de fibrine et de plaquettes, ne présentent pas de réponse inflammatoire significative, ne deviennent pas néovascularisées, ne présentent pas de fibrose, ne contractent pas et ne forment pas de cicatrice. Dans les plaies fœtales, le collagène est déposé en formation réticulaire, le rendant indistinct par rapport au derme normal adjacent, alors que dans les plaies d'adultes, il est déposé en gros paquets perpendiculaires à la surface de la plaie. Le nombre de plaquettes et de macrophages, une source majeure de TGF- β_1 dans les plaies adultes, est significativement réduit dans les plaies embryonnaires ou fœtales (Longaker et coll., 1994).

Le TGF- β_1 et le TGF- β_2 sont absents des plaies fœtales (Whitby et Ferguson, 1991), alors que le TGF- β_3 y est présent en quantité égale à celle qu'on retrouve dans les plaies adultes (Sullivan et coll., 1995). Cependant, lorsqu'on ajoute du TGF- β_1 aux plaies fœtales, il se produit une réponse fibrotique accompagnée d'une augmentation significative de la cellularité (Roberts et Sporn, 1996). Ce phénomène renforce l'hypothèse que le TGF- β est à l'origine de la fibrose dans les plaies cutanées et que les tissus fœtaux possèdent les récepteurs permettant une réponse envers ce dernier facteur de croissance. Donc, une mauvaise régulation du TGF- β pourrait être à l'origine de complications pathologiques lors de guérison. Puisque la production excessive de TGF- β_1 et de TGF- β_2 pourrait être une composante clé de la formation d'une cicatrice irréversible, elle procure une cible intéressante pour des manipulations thérapeutiques.

2.3 Guérison de plaie dermique chez le cheval

La peau est un organe complexe qui, chez l'adulte, ne peut pas se régénérer. Elle doit donc être réparée après une lésion. Dans des circonstances normales, le processus de guérison est réalisé par le débridement de la plaie, la protection du lit de la plaie par un tissu de granulation hautement vascularisé et résistant, la réduction de la taille de la plaie par contraction et la migration des cellules épithéliales qui assure une surface de protection permanente. Cependant, ce n'est pas toujours le cas chez le cheval, car les premiers stades de guérison sont souvent excessifs et peuvent conduire à une résolution anormale.

2.3.1 Guérison par intention secondaire

La guérison par intention secondaire est nécessaire lorsque la plaie ne peut être suturée et cela se produit particulièrement au niveau de la portion distale des membres, puisque la tension excessive de la peau, la contamination extrême de la plaie et la perte massive de tissus à cet endroit écartent fréquemment la possibilité de fermeture primaire (Bertone, 1989). La guérison par intention secondaire dépend de la formation d'un nouveau tissu conjonctif, d'angiogénèse, de contraction pour diminuer la taille de la blessure et de réépithélialisation pour couvrir la surface lésée. Cependant, ce mode de guérison est souvent associé à des complications spécifiques à l'aspect distal des membres du cheval, comme la formation d'un tissu de granulation exubérant, aussi appelé bouton de chair. Ce tissu de granulation est inesthétique, sujet à l'abrasion et aux infections secondaires et peut produire une restriction mécanique au mouvement normal. Il retarde également la guérison de plaie en interférant avec la réépithélialisation et la contraction.

La cause spécifique de la fibroplasie excessive chez le cheval demeure inconnue. Les facteurs proposés comme étant associés à ce phénomène au niveau des membres équins incluent le mouvement, l'infection, le faible apport sanguin, la tension excessive de la peau adjacente, l'inflammation après l'application d'irritants topiques, le

débalancement du métabolisme du collagène et l'absence relative de muscles ou autres tissus mous sous-jacents à la plaie (Bertone, 1989). Certains de ces facteurs peuvent résulter ou être attribuables à un profil de cytokines qui diffère de celui des plaies thoraciques. Par exemple, les plaies mises sous bandage maintiennent un environnement hypoxique et retiennent les cellules inflammatoires à leur surface, ce qui stimule l'angiogénèse et la fibroplasie. En effet, il a été observé que l'application d'un bandage à une plaie appendiculaire augmente la production de tissu de granulation (Barber, 1990). L'hypoxie peut stimuler la synthèse de TGF- β_1 (Hakkinen et coll., 1996) et peut augmenter le nombre de récepteurs pour le TGF- β chez une sous-population particulière de fibroblastes (Falanga et Julien, 1990); ces deux événements entraîneront une augmentation de la production de collagène par les fibroblastes.

Une différence dans les caractéristiques de croissance fibroblastique entre les plaies des membres et du corps pourrait également être un facteur contribuant au développement du bouton de chair. Parce que les plaies appendiculaires sont plus sujettes à la production d'un tissu de granulation exubérant, il a été suggéré que les fibroblastes dermiques des membres ont une croissance plus rapide que ceux provenant du tronc (Bacon-Miller et coll., 2000). En effet, malgré qu'*in vitro* le contraire fut déterminé, il a été observé qu'*in vivo* l'activité mitotique des fibroblastes venant de la croupe diminue rapidement en une semaine, alors que celle des fibroblastes appendiculaires reste significativement élevée (Wilmink et coll., 1999).

La guérison de plaie par intention secondaire au niveau des membres équins est donc souvent un processus lent et compliqué, alors que la guérison des plaies corporelles s'effectue la plupart du temps sans problème. Ces différences peuvent être attribuées à une différence de contraction des plaies, qui est plus prononcée au niveau des plaies thoraciques (Theoret et coll., 2001) et de la croupe (Wilmink et coll., 1999). En plus d'accélérer la guérison, la contraction améliore l'apparence cosmétique et la force de la cicatrice, puisqu'elle diminue la surface de la plaie devant être recouverte d'un nouvel épithélium fragile et dénué d'annexes cutanées (Jacobs et coll., 1984). Donc, chez le cheval, un degré de contraction élevé est désirable lors de la guérison, contrairement à l'homme, où il peut entraîner la formation de contractures et de cicatrices inesthétiques. Le degré de contraction est déterminé par les capacités contractiles innées des cellules et

par les conditions tissulaires locales. Chez le cheval, les plaies des membres contractent moins que les plaies du tronc (Walton, 1972). Toutefois, cette différence n'est pas causée par une différence au niveau des capacités contractiles innées des myofibroblastes (Wilmink et coll., 2001). Cela implique donc que des facteurs environnementaux, comme le profil de cytokines lors de la réponse inflammatoire, déterminent l'étendue de la contraction lors de la guérison. Comme il a déjà été mentionné, le tissu de granulation exubérant retarde ou empêche la guérison en nuisant à la contraction. En effet, les myofibroblastes du tissu de granulation des plaies appendiculaires équines sont organisés de façon chaotique, alors que les myofibroblastes des plaies du tronc sont ordonnés (Wilmink et coll., 1999; Schwartz et coll., 2002). Comme c'est le degré d'organisation plutôt que le nombre de myofibroblastes qui détermine la vitesse et l'étendue de la contraction, l'organisation inadéquate des myofibroblastes dans les plaies de la région métatarsienne pourrait également être responsable de la contraction minimale de ces plaies chez le cheval.

Le tissu de granulation exubérant nuit également à la réépithélialisation. En effet, lorsqu'il devient protubérant, l'activité mitotique des cellules épithéliales est remarquablement réduite, suggérant que le bouton de chair peut inhiber la mitose des cellules épithéliales en plus d'être un obstacle physique à la migration de ces cellules dans le lit de la plaie (Wilmink et coll., 1999). D'ailleurs, comparativement aux plaies du thorax, les plaies situées sur les membres ont une plus faible vitesse de réépithélialisation (Jacobs et coll., 1984).

2.3.2 Rôles du TGF- β et de ses récepteurs

À l'exception des corticostéroïdes, aucun traitement connu actuellement ne conduit de façon systématique à la prévention du bouton de chair chez le cheval. Cela n'est pas surprenant, puisque sa pathogénèse n'a pas encore été établie. Toutefois, l'usage des corticostéroïdes n'est pas recommandé puisqu'ils inhibent certaines phases de la guérison de plaie, notamment via leur effet angiostatique (Hashimoto, 2002).

Cependant, il devient de plus en plus évident que certaines cytokines et facteurs de croissance autocrines ou paracrines sont importants dans la biologie cutanée.

Puisque la guérison de plaie des membres équins démontre souvent une fibroplasie excessive, certains chercheurs se sont intéressés à comparer la cinétique d'expression du facteur pro-fibrotique TGF- β_1 dans la guérison de plaies appendiculaires et corporelles chez cette espèce. Il a ainsi été démontré que l'expression de la protéine TGF- β_1 persiste à travers la phase proliférative de guérison dans les plaies localisées à l'aspect distal des membres, alors que dans les plaies corporelles, elle retourne à un niveau de base à la fin de la phase inflammatoire (Théorêt et coll., 2001; van den Boom et coll., 2002). Également, une production plus accrue d'ARNm pour le TGF- β_1 , associée à une hausse semblable d'ARNm pour le collagène de type I, a été démontrée pendant quatre semaines dans des plaies de membres par rapport à celles situées au niveau pectoral (Schwarz et coll., 2002). Cela supporte l'hypothèse qu'une surproduction de TGF- β_1 serait liée à la fibrose cutanée chez le cheval, puisque ce sont les plaies des membres qui sont prédisposées au développement de boutons de chair, alors que les plaies corporelles guérissent normalement. Il a été démontré par immunohistochimie que ce sont les macrophages et les fibroblastes qui sont responsables de l'augmentation de l'expression du TGF- β_1 (Théorêt et coll., 2002a). Cependant, il a été impossible d'établir de façon significative que l'expression du TGF- β_1 dans les plaies développant un bouton de chair soit plus élevée que dans les plaies guérissant normalement (Théorêt et coll., 2002b). Par contre, il est possible qu'une accumulation temporaire d'une sous-population de fibroblastes possédant des capacités accrues de répondre au TGF- β survienne dans les plaies cutanées chez le cheval, ce qui mènerait à une guérison pathologique (Schmid et coll., 1998). Donc, même si les concentrations de TGF- β_1 dans les plaies appendiculaires qui cicatrisent normalement et dans celles qui développent un bouton de chair sont semblables, les fibroblastes du bouton de chair pourraient être plus réceptifs au TGF- β_1 . Il serait donc important d'étudier la localisation cellulaire des récepteurs pour le TGF- β_1 et de déterminer leur nombre relatif dans des échantillons provenant de plaies thoraciques et appendiculaires

équines qui guérissent normalement et de plaies de membres équins qui développent un bouton de chair.

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Chevaux

Les échantillons tissulaires ont été prélevés sur huit chevaux mâles de race croisée âgés de deux à quatre ans, pesant de 305 à 440 kg et ayant démontré des résultats normaux lors d'examens physiques et hématologiques. Les chevaux ont été gardés dans des box durant toute la période de l'étude, qui a été menée en accord avec les directives établies par le Conseil Canadien des Soins Animaux. Les individus ont été placés de façon aléatoire dans deux groupes d'animaux, chacun comptant quatre chevaux. Le premier groupe a été utilisé pour étudier la cicatrisation normale de plaie sur les membres et le thorax, alors que le deuxième groupe a servi à l'étude de la guérison normale et pathologique des plaies des membres.

3.2 Procédure chirurgicale

Les chevaux ont été anesthésiés et couchés en décubitus latéral. Pour le premier groupe, six plaies cutanées de pleine épaisseur ont été créées à l'aide d'un bistouri à la face latérale de la région métacarpienne et de la paroi thoracique. Les plaies horizontales (2 cm x 5 mm) ont été placées en colonne verticale, séparées les unes des autres par un espace de 2 cm. Pour le deuxième groupe, la même procédure a été utilisée, la chirurgie n'étant toutefois pratiquée que sur les membres. Les plaies n'ont pas été suturées et les chevaux ont été examinés quotidiennement afin de détecter des signes d'inconfort ou de problèmes systémiques. Les plaies furent laissées sans traitement, à l'exception de celles devant servir de modèle de bouton de chair, lesquelles furent mises sous bandage changé quotidiennement pour la durée de l'étude. Aucun médicament ne fût administré.

3.3 Prélèvement des échantillons

Pour éviter des traumatismes répétitifs, une seule biopsie par plaie a été effectuée. Celles-ci ont été faites à 12 et 24 heures (ce qui représente la phase d'inflammation aiguë de la guérison), puis à 2, 5, 10 et 14 jours après la chirurgie (ce qui représente la phase proliférative de la guérison). Les chevaux ont été tranquilisés et les plaies sélectionnées pour la biopsie ont été délicatement nettoyées à l'aide d'une solution saline (NaCl 0,9%) puis infiltrées avec 0,5 à 1 mL d'une solution de 2% d'anesthésique local (Xylocaine; AstraPharma Inc, Mississauga, Ontario, Canada). Des biopsies de pleine épaisseur ont été prélevées au pourtour des plaies pour inclure une bande cutanée périphérique de 2 à 3 mm d'épithélium en migration et une bande de 2 à 3 mm de tissu de granulation. Les biopsies ont été prises de la plaie la plus distale à la plaie la plus proximale, afin de minimiser l'impact de la réaction inflammatoire de la plaie biopsiée sur les plaies adjacentes, et les tissus ont été fixés au formol-alcool et inclus dans de la paraffine.

3.4 Immunohistochimie

Les blocs de paraffine contenant les échantillons tissulaires ont été sectionnés en tranches de 6µm, qui ont été montées sur des lames. Chaque tranche a été déparaffinée à l'aide de toluène 100%, réhydratée dans des solutions décroissantes d'éthanol (100%, 95%, 80% et 70%) et équilibrée dans un tampon salin Tris contenant 0,3% de Triton (TTBS) pendant 10 minutes à température de la pièce. L'activité peroxydase endogène des tissus a été bloquée à l'aide d'une solution de 0,3% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de méthanol, pendant 30 minutes à température de la pièce. Chaque lame a ensuite été rincée avec du TTBS. Les antigènes d'intérêts ont été démasqués en plaçant les tissus au micro-onde pendant 5 minutes (niveau de puissance 6) dans un tampon citrate 10mM de pH 6,00 ayant préalablement été bouilli. Les tissus ont ensuite été refroidis avant de bloquer la coloration non-spécifique pendant 20 minutes à température de la pièce à l'aide de sérum normal de lapin 6% (Vectastain kit, Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada). Les anticorps IgG polyclonaux de lapin

contre les récepteurs I (V-22) et II (C-16) du TGF- β (Santa Cruz Biotechnology: Santa Cruz, Californie, Etats-Unis) ont été dilués séparément dans cette même solution de blocage jusqu'à concentration finale de 1 μ g/mL. Ces solutions ont été ajoutées aux tissus, qui ont été incubés pendant 24 heures à 4 °C dans une chambre humide. Les échantillons ont ensuite été rincés à l'aide de TTBS et incubés pendant une heure à température de la pièce dans une chambre humide avec des anticorps secondaires de chèvre biotinylés anti-lapin (IgG; Vectastain kit, Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada) dilués dans le sérum normal de lapin (1:45). Les lames ont été rincées à l'aide d'un tampon salin phosphate (PBS) 1X et chacune a été à nouveau incubée pendant 45 minutes à température de la pièce dans une chambre humide avec 200 μ l de complexe ABC (Vectastain kit, Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada). Les tissus ont été rincés à l'aide du PBS 1X avant d'être incubés pendant deux minutes à température de la pièce dans un chromatogène diaminobenzidine (CedarLane Laboratories Ltd. Hornby, Ontario, Canada). Les échantillons ont ensuite été rapidement rincés à l'aide d'eau distillée, contre-colorés pendant 15 secondes dans une solution de 33% d'hématoxilline Gill formulation 2 (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, Etats-Unis) et d'eau distillée et rincés à l'eau jusqu'à ce que celle-ci soit claire. Les tissus colorés ont été déshydratés dans des solutions croissantes d'éthanol (70%, 80%, 95% et 100%) et nettoyés par du toluène 100%. Du Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, Etats-Unis) a été utilisé afin de fixer les lamelles aux lames. L'intensité immunocolorante des tissus a été évaluée visuellement par deux évaluateurs indépendants. La coloration non-spécifique a été analysée en omettant les anticorps primaires et en les remplaçant par le sérum normal de lapin (contrôles négatifs). Des follicules ovariens de bovins, reconnus pour contenir des récepteurs pour le TGF- β (Ouellette et coll., article soumis) ont été utilisés comme contrôles positifs. Ces deux types de contrôles ont été utilisés comme critères de référence.

4 ARTICLE SOUMIS

Spatial and Temporal Expression of Types I and II Receptors for Transforming Growth Factor β in Normal Equine Skin and Dermal Wounds

**ISABELLE DE MARTIN, BSc, CHRISTINE L. THEORET, DMV, PhD,
Diplomate ACVS**

From the Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

Supported by a grant from the Fonds du Centenaire, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal.

This report represents a portion of a dissertation submitted by the first author to the
Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal as partial fulfillment of the
requirements for an MSc degree.

No reprints available.

Address correspondence to Christine L. Theoret, Département de biomédecine
vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-
Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Email: [REDACTED]

ABSTRACT

Objective-To describe immunolocalization of TGF- β receptors (RI and RII) in normal equine skin and wounds of the thorax and the limb, healing normally or with exuberant granulation tissue (EGT).

Study Design-Six wounds on one metacarpus and one midthoracic area per horse in group A, and on both metacarpi of each horse in group B, one of which was bandaged to stimulate EGT. Immunohistochemistry detected RI and RII expression in wound margins.

Animals-Eight horses, randomly assigned to one of two study groups.

Methods-Neutralizing polyclonal anti-rabbit RI and RII antibodies were used to detect spatial expression of RI and RII in biopsies obtained before wounding and at 12 and 24 hours, and 5, 10 and 14 days.

Results-RI and RII co-localized in both unwounded and wounded skin. There were no staining differences in cell types between tissues obtained from the limb and the thorax, or from normally-healing limb wounds and limb wounds developing EGT, at any time. By virtue of increased cellularity within EGT, staining intensity of limb wounds exhibiting 'proud flesh' greatly surpassed that of limb wounds healing normally and of thoracic wounds, during the proliferative phase of repair.

Conclusions-Strong expression of RI and RII, particularly in limb wounds developing EGT, suggests that the signalling machinery for stimulation of matrix proteins is in place to contribute to scarring.

Clinical Relevance-This information may help determine the appropriate time for using receptor antagonists to prevent scarring of limb wounds of horses.

INTRODUCTION

Wounds are a widespread problem in horses and exert an important financial impact on the equine industry since their treatment is labor intensive and expensive. To compound the problem, repair of limb wounds is often associated with species-specific complications, such as development of exuberant granulation tissue (EGT), also known as “proud flesh”, and subsequent retardation of contraction and epithelialization¹, which compromise the esthetic and functional outcome. Equine athletes with poorly healed dermal wounds must be retired from competition and may be euthanized. Aside from corticosteroids, which can exert undesirable side effects^{2,3}, no current treatments consistently prevent or eliminate the development of EGT on wounds of the distal limb of horses. The pathophysiology of proud flesh must first be elucidated in order for appropriate preventive and therapeutic methods to be instituted.

Wound repair is regulated by a cascade of inflammatory mediators including cytokines⁴, which can be defined as peptides that act through cell surface receptors to cause autocrine, paracrine, and/or endocrine stimulation of cell migration and proliferation, as well as protein synthesis. Growth factors are those cytokines exerting primarily mitogenic effects. The transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily plays a key role in dermal repair⁵. TGF- β_1 is fibrogenic as it favors both angiogenesis and extracellular matrix (ECM) accumulation. ECM production results from the chemoattractant, proliferative and synthetic effects of TGF- β_1 on fibroblasts. Matrix proteins are thus synthesized, while matrix breakdown is prevented by decreased production of degradative enzymes, the matrix metalloproteinases (MMPs)⁵, and increased production of inhibitors to these MMPs, also functions of TGF- β_1 . Indeed, a causal relationship has been established between TGF- β_1 and fibrosis of skin⁶ and other organs.

Three major signal-transducing receptors for TGF- β have been identified. These cell surface receptors have cytoplasmic serine/threonine kinase domains⁷, and have been named type I (RI), type II (RII) and type III (RIII or betaglycan). Betaglycan is a non-signalling proteoglycan which presents TGF- β to RII⁸. Once ligand has bound to RII, it is recognized by RI which is subsequently recruited into the complex and

phosphorylated by RII⁹. This action initiates a cascade of events that transmit signals to downstream substrates, one of which is Smad1, a transcription factor mediating responses to the TGF- β family¹⁰. Thus, TGF- β_1 activity necessitates the simultaneous presence of both RI and RII.

We've previously shown that TGF- β_1 levels persist throughout the proliferative phase of healing in equine limb wounds, whereas they quickly return to baseline at the end of the inflammatory phase in thoracic wounds¹¹. This has recently been confirmed in a similar study by Wilmink¹². These observations suggest that persistent TGF- β_1 levels may result in continuous stimulation of the inflammatory response in limb wounds¹² and lead to the formation of EGT since equine limb but not body wounds are predisposed to the development of proud flesh. Indeed, it has been suggested that transient upregulation of TGF- β expression is important for normal wound repair, whereas sustained overproduction of this growth factor contributes to tissue fibrosis¹³. A second study was undertaken to identify the distribution of augmented TGF- β_1 expression¹⁴. It showed that TGF- β_1 is upregulated within skin upon injury, particularly in macrophages and wound fibroblasts¹⁴, which is consistent with a regulatory role for TGF- β_1 in the cellular biology of equine wound repair. However, this study only predicted the potential for TGF- β_1 activity since the antibody reacted with both latent and active TGF- β_1 ¹⁴. The study reported herein was thus undertaken on the same model in order to determine whether a concomitant expression of both TGF- β_1 ligand and its receptors existed, which would imply TGF- β_1 activity as well as autocrine and paracrine regulation of TGF- β_1 function. Furthermore, anatomical differences in the distribution of TGF- β receptors have been reported¹⁵ and an abundance of RI and/or RII in the skin of the distal extremities of the horse might very well explain why wounds in this particular area are predisposed to the formation of excessive granulation tissue.

Finally, a third study performed in our laboratory determined that although limb wounds healing with experimentally-induced EGT tend to exhibit higher concentrations of fibrogenic TGF- β_1 than those healing normally, the difference is not statistically significant¹⁶. Transient accumulation of a subset of RI and RII-overexpressing fibroblastic cells has recently been noted in deep dermal wounds exhibiting excessive fibrosis¹⁷. The authors speculate that during the repair process, TGF- β released from

degranulating platelets and secreted by inflammatory cells selectively recruits and stimulates a subpopulation of TGF- β -responsive fibroblasts that are predisposed to produce elevated levels of matrix proteins¹⁷. This subset persists longer in human hypertrophic scars, which resemble equine proud flesh, than in normally healing wounds¹⁷. According to this theory, although the concentrations of TGF- β_1 within normal limb wounds and those developing EGT were similar¹⁶, fibroblasts within the latter wounds could be more responsive to TGF- β_1 and its fibrogenic effects. It thus remains to be determined whether proud flesh is the consequence of a persistence of TGF- β overresponsive fibroblasts generated during the repair process. To address this query we have investigated, by immunohistochemistry, the cellular distribution of RI and RII in normal equine skin and in limb and thoracic wounds during the normal transition of granulation tissue to scar and the pathologic development of EGT.

MATERIALS AND METHODS

Horses

Eight mixed-breed male horses (2 to 4 years of age; 305 to 440 kg) with normal findings on physical and hematologic examinations were housed in box stalls for the study, which was carried out in accordance with guidelines established by the Canada Council on Animal Care. The horses were randomly assigned to one of two study groups, each consisting of four subjects. The first group was used to study normal healing of wounds in different locations (group A) while the second group was used to study normal and pathologic healing in limb wounds (group B).

Surgical Procedure

Horses were anesthetized and positioned in lateral recumbency. Six full-thickness excisional skin wounds were created on the lateral aspects of the metacarpus and midthoracic wall. A sterile template was used to standardize location, size and spacing of the incisions. Wounds (2 cm X 5 mm) were aligned in a vertical column with their long axes oriented horizontally and were separated from each other by a space of 2 cm. The wounds were not sutured. The excised skin from the third lowermost wound was used as a baseline (time 0) sample. In group A horses, one randomly assigned forelimb and the ipsilateral thoracic wall area were used, whereas in group B horses, the same procedure was performed on both forelimbs. Group B horses had one randomly assigned forelimb bandaged postoperatively for the duration of the study (14 days) to induce formation of EGT, while the contralateral forelimb was left unbandaged¹⁶. The horses were examined daily for signs of discomfort or systemic illness. Non-steroidal anti-inflammatory drugs were not administered.

Biopsy Samples

To avoid repeated trauma, biopsies of each wound were performed only once. Tissue samples were collected from wound margins at 12 and 24 hours (representing the acute inflammatory phase of repair), and 2, 5, 10, and 14 days (representing the proliferative phase of repair). Horses were sedated, and wounds selected for biopsy

were gently cleaned with saline (0.9% NaCl) solution-soaked gauze, then locally infiltrated with 0.5 to 1 mL of 2% lidocaine hydrochloride anesthetic (Xylocaine; AstraPharma Inc, Mississauga, Ontario, Canada). Full-thickness biopsies were taken from wound margins to include a 2- to 3-mm strip of peripheral skin, the migrating epithelium and a 2- to 3-mm strip of granulation tissue. Biopsies were performed of each of the lowermost wounds of each set (limb and thorax, unbandaged and bandaged limbs) of 6 at 12 hours, with subsequent biopsies taken in ascending order up the wound column. Each tissue sample was divided in two, with 1 portion used for histology and immunohistochemistry¹⁴ and the other portion for growth factor analysis, as reported previously^{11,16}.

Immunohistochemistry

Tissues were fixed in acid-alcohol formalin and processed as 6 μ m paraffin sections. Tissue sections were deparaffinized in 100% toluene, rehydrated in ethanol solutions of decreasing concentrations (100%, 95%, 80% and 70%), and equilibrated in Tris-buffered saline containing 0.3% Triton (TTBS) for 10 minutes at room temperature. Endogenous peroxidase activity was quenched with 0.3 % H₂O₂ in methanol for 30 minutes at room temperature. Each slide was washed in TTBS. Antigen demasking was performed by placing the slides in a microwave for 5 minutes (power level 6), in 10 mM of citrate buffer at pH 6.00 having first been boiled. Tissue samples were then cooled before blocking non-specific staining with 6 % normal rabbit serum in phosphate buffered saline (PBS) 1X. Affinity-purified rabbit polyclonal IgG antibody raised against synthetic peptides of RI and RII were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California). The antibodies used for this study were TGF- β RI (V-22) and TGF- α RII (C-16); they were diluted in the blocking solution to a final concentration of 1 μ g/mL and separately incubated with the sections in a moist chamber at 4°C for 24 hours. Sections were then washed in TTBS and incubated in a moist chamber for 1 hour at room temperature in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (IgG, Vectastain Kit, Vector Laboratories Inc, Burlington, Ontario, Canada) diluted 1:45 in normal rabbit serum. Each slide was washed in 1X PBS and further incubated in a moist chamber for 45 minutes at room temperature with 200 μ l of ABC reagent (Vectastain ABC kit,

Vector Laboratories Inc, Burlington, Ontario, Canada). The sections were washed in 1X PBS and then incubated for 2 min at room temperature in diaminobenzidine chromagen (CedarLane Laboratories Ltd. Hornby, Ontario, Canada) followed by washing in running tap water. Sections were counterstained in hematoxylin Gill #2 (Fisher scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA) for 15 seconds, quickly rinsed in running tap water until the water ran clear, dehydrated in ethanol solutions of increasing concentrations (70%, 80%, 95% and 100%), cleared in 100% toluene, and mounted with Permount (Fisher scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA). Immunostaining intensity of the tissue samples was evaluated by visual examination, in a blinded fashion and independently by both authors. Non-specific staining was investigated by omitting the primary antibody, and also by replacing it with normal rabbit sera. In both circumstances, the immunostaining was eliminated. These negative controls were used as reference standards. Bovine ovarian follicles, known to express TGF- β RI and RII¹⁸, were used as positive controls.

RESULTS

There were no apparent cellular differences in immunoreactivity between tissues obtained from the limb and the thorax, or between those obtained from normally-healing limb wounds and limb wounds developing EGT, at any time during the study. RI and RII expression was co-localized in both the unwounded and wounded skin and was present in the same cell types as previously determined for TGF- β_1 ligand. The distribution of RI and RII was primarily cellular, with no immunoreactivity seen in the extracellular spaces.

Normal Skin

Unwounded equine skin from the limb and the thorax showed strong RI and RII immunostaining throughout all epidermal layers and appendages (Fig 1a). Specifically, the hair follicles showed positive staining in the inner and outer root sheaths, and the sebaceous and sweat glands were strongly positive. Immunoreactivity for both receptor types was absent from the scant number of dermal fibroblasts present, while capillary endothelial cells showed weak staining for both RI and RII (Fig 2). Normal rabbit serum, used as a control, showed no immunoreactivity with the horse skin (Fig 1b).

Acute Inflammatory Phase of Wound Repair

Epidermis and its Appendages. Twelve hours after injury, the epidermis and its appendages adjacent to the wound continued to show strong staining for both receptors. In contrast to what was observed for TGF- β_1 ligand¹⁴ where migrating epithelial tips at the wound margins were devoid of TGF- β_1 immunoreactivity from 12 to 24 hours after injury, immunostaining for both receptor types was present in the sparse neoepithelium present at this time.

Inflammatory Infiltrate, Granulation Tissue, and Dermis. Neutrophils infiltrated the wound bed 12 hours after injury and were followed by macrophages by 24 hours¹¹. Weak immunoreactivity for both RI and RII was observed in the neutrophils whereas none was apparent in macrophages at this time. It is noteworthy that

macrophages had positive cytoplasmic staining for TGF- β_1 ligand by 24 hours¹⁴, whereas immunostaining for the receptors did not increase until day 5.

Positive immunostaining for both types of receptors was apparent in a small number of fibroblasts immediately adjacent to the wound 12 hours after injury. As the inflammatory phase progressed, immunoreactivity increased concomitant with increased cellularity of the wound.

The above stated observations noted during the inflammatory phase of repair were applicable to all types of wounds, regardless of their location or the amount of granulation tissue that ultimately developed.

Proliferative Phase of Wound Repair

Epidermis and its Appendages. RI and RII immunostaining intensity peaked from 10-14 days after wounding in both the epidermis and the dermis immediately adjacent to the wound. New epithelium was apparent in all biopsy samples as of day 5 post-wounding. This neoepithelium was often hyperplastic, particularly in limb wounds, and always immunoreactive for both RI and RII in all of its layers, although staining was slightly less intense than in adjacent unwounded epithelium (Fig 3). Reepithelialization was complete within 14 days for thoracic wounds but not for limb wounds, regardless of whether healing progressed normally or led to the development of EGT.

Inflammatory Infiltrate, Granulation Tissue, and Dermis. Inflammation gradually resolved from 5 days onward in thoracic wounds whereas it persisted in limb wounds until the end of the study (14 days)^{11,16}. A temporal difference was noted between the presence of TGF- β_1 ligand¹⁴ and its receptors in macrophages persisting throughout the proliferative phase. Indeed, staining for the ligand began to fade after 5 days¹⁴, whereas staining for the receptors was apparent only from that time on. Immunoreactivity for both RI and RII was then sustained for the duration of the study in a moderate number of macrophages, particularly those in the EGT of bandaged limb wounds.

By 5 days, there was strong evidence of angiogenesis in the granulation tissue filling the wound bed. Both types of receptors were detected in all layers of the new capillaries. Staining was also increased in older capillaries adjacent to the wound bed, compared to what had been identified in normal, unwounded skin. More new capillaries were detected in limb than in thoracic wounds by the end of the study, particularly in those developing EGT.

As remodeling progressed, the dermis demonstrated dense cellularity and was mainly composed of intensely immunopositive fibroblasts, particularly in limb wounds that exhibited more fibrosis than their thoracic counterparts (Fig 4). The increased immunostaining for RI and RII was locally confined to the dermis adjacent to the wound bed, and most fibroblasts distant to this area did not stain for receptors.

Exuberant Granulation Tissue (EGT). All bandaged limb wounds developed proud flesh within 10 days of wound creation¹¹. In EGT having developed in bandaged limb wounds by 10 days, the majority of cells showing fibroblastic morphology revealed abundant staining of RI and RII (Fig 5). Spindle-shaped fibroblasts aligned parallel to the wound surface, probably myofibroblasts, were strongly immunoreactive at this time. Endothelial cells of the numerous new capillaries, as well as macrophages within this tissue, also exhibited strong immunostaining of both RI and RII. By virtue of the increased cellularity of this granulation tissue, the overall immunostaining intensity of the limb wounds exhibiting proud flesh greatly surpassed that of unbandaged limb wounds healing normally, and of thoracic wounds.

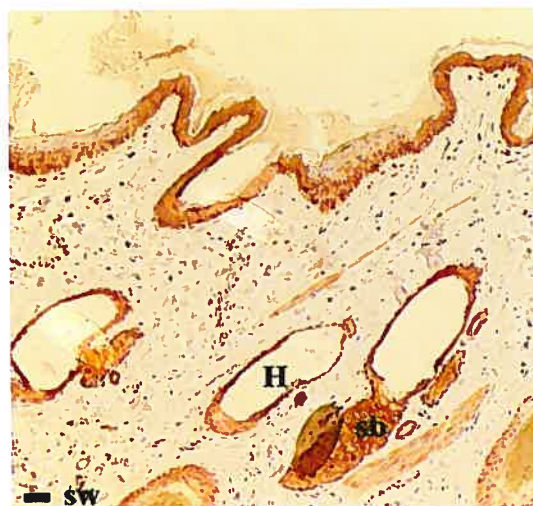


Fig 1. (A) Immunohistochemical localization of TGF- β RI in normal, uninjured equine thoracic skin (10X; bar = 100 μ m). RI is present in the cells of all epidermal layers. Intense staining is obvious in the root sheath cells of hair follicles (H) as well as in the cells of sweat (SW) and sebaceous (SB) glands. Vectastain ABC and hematoxylin Gill #2 stain.

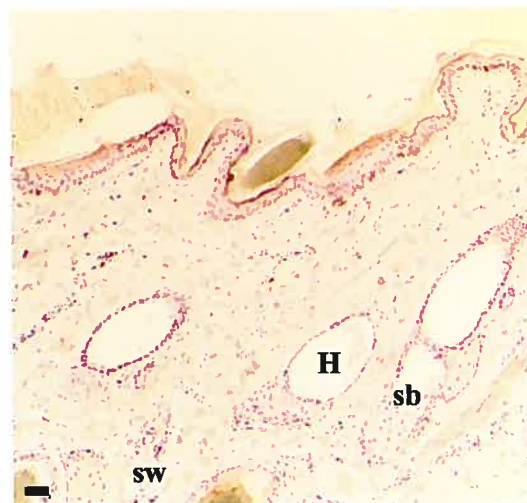


Fig 1. (B) Immunohistochemical localization of TGF- β RI in normal, uninjured equine thoracic skin (10X; bar = 100 μ m). Negative control. Absence of staining of all cellular components. Vectastain ABC and hematoxylin Gill #2 stain.

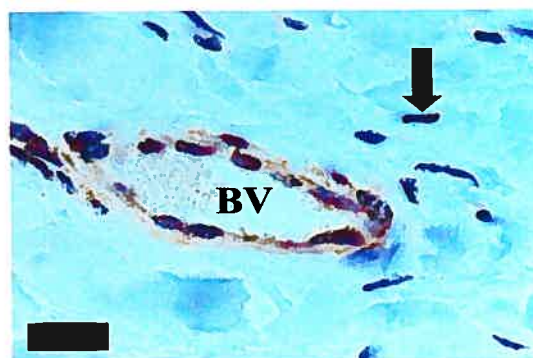


Fig 2. Immunohistochemical localization of TGF- β RI in normal, uninjured equine thoracic skin (60X; bar = 100 μ m). Immunoreactivity was absent from dermal fibroblasts (arrows), while capillary endothelial cells showed weak staining for RI (BV = blood vessels). Vectastain ABC and hematoxylin Gill #2 stain.



Fig 3. Immunohistochemical localization of TGF- β RI in an equine limb wound at 14 days (10X; bar = 100 μ m). The neoepithelium was hyperplastic and immunoreactive for RI in all of its layers (arrow) although staining was slightly less intense than in adjacent unwounded epithelium (arrowheads). Vectastain ABC and hematoxylin Gill #2 stain.

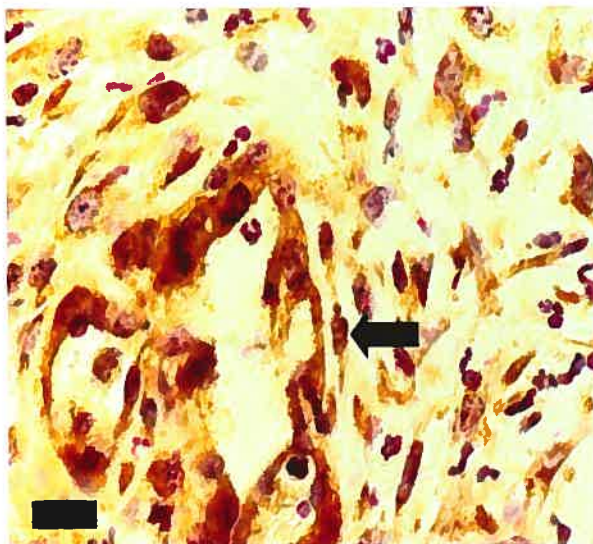


Fig 4. Immunohistochemical localization of TGF- β RI in an equine limb wound at 14 days (60X; bar = 25 μ m). The dermis demonstrated dense cellularity and was mainly composed of intensely immunopositive fibroblasts (arrow). Capillary endothelial cells showed staining for RI (BV = blood vessels). Vectastain ABC and hematoxylin Gill #2 stain.

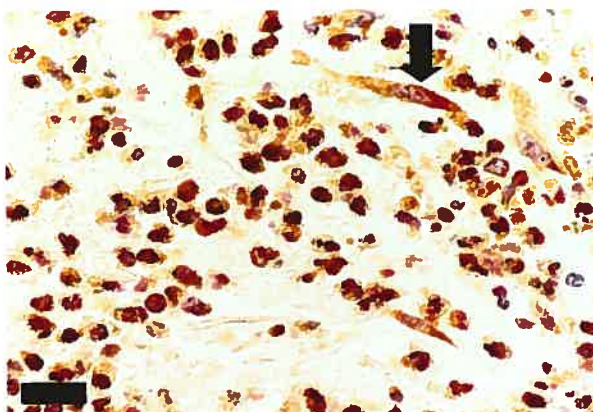


Fig 5. Immunohistochemical localization of TGF- β RII in EGT having developed in equine bandaged limb wounds at 10 days (60X; bar = 25 μ m). The majority of cells showing fibroblastic morphology (arrow) revealed abundant staining. Vectastain ABC and hematoxylin Gill #2 stain.

Table I. Temporal differences between *TGF- β 1* ligand¹³ and RI/RII immunostaining

	Days after wounding											
	0		0,5		1		5		10		14	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Epidermis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Epidermal appendage	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inflam. exudate												
Neutrophils	na	na	-	+/-	+	+	+	+	+	+	na	na
Monocytes	na	na	na	na	+	-	+/-	+	+/-	+	-	+
Migrating epithelial cells	na	na	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Dermis												
ECM	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Fibroblasts	na	na	na	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Endothelial cells	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+

(+): positive expression; (-): negative expression; (+/-): weak expression; (na): not applicable; (L): ligand; (R): RI and RII receptors

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first report to localize expression of TGF- β receptors type I and type II during wound repair of equine skin. We have previously shown that TGF- β_1 is expressed in a distinct spatial and temporal pattern throughout the various phases of excisional wound repair. As the presence of receptors determines cellular responsiveness, we have currently examined, by immunohistochemistry, the localization of RI and RII throughout normal and pathologic repair up to 14 days after wounding in the horse. We observed that RI and RII are constitutively expressed in healthy uninjured cutaneous epithelium and that their expression is upregulated, concomitant with that of TGF- β_1 ligand¹⁴, in several cell types involved in repair. This implies potential spatial and temporal activity of TGF- β_1 , as well as autocrine and paracrine regulation of TGF- β_1 function. Importantly, expression was noted in association with wound fibroblasts in areas of newly deposited ECM components, which is consistent with the fibrogenic role attributed to TGF- β_1 . We also noted that in both unwounded and wounded skin, the two receptors are co-localized. This is consistent with the mechanism of signal transduction described for TGF- β , where simultaneous presence of RI and RII is required for ligand activity. This newly acquired information should aid in the development of receptor antagonists as a therapeutic approach to scarring and fibrosis.

A similar study performed in sheep¹⁹ determined that immunoreactivity for TGF- β receptors lagged 1 to 5 days behind TGF- β ligand immunostaining. The authors postulated that the prior presence of ligand may upregulate its receptors for function, or that this lag period may be due to local processing of latent TGF- β . In the present study, we found that most cell types expressed RI and RII simultaneously with TGF- β_1 ligand¹⁴, with the exception of inflammatory macrophages and newly migrating epithelial cells. It is possible that equine cells show a more rapid response to the presence of ligand, either as a result of a greater concentration of the molecule or because the ligand is already in an active form within the wound environment. In the case of the macrophage, we noted a lag period between the time ligand was expressed and the time receptors could be detected, similar in magnitude to that reported by

Gold.¹⁹ It is probable that receptor upregulation in these equine inflammatory cells also occurs very rapidly in response to the presence of ligand following wounding, however, the number of receptors may be insufficient to be detected by immunohistochemistry, a relatively insensitive method. Although RI and RII may have eluded detection by the chosen antibodies in the immediate post-wounding period, this is not synonymous with deficient TGF- β_1 activity at the cellular level, since the ligand exerts a powerful regulatory activity and may not require a great number of receptors for function⁵.

In the case of newly migrating epithelial cells derived from wound margins, we had previously noted an absence of TGF- β_1 ligand from 12 hours to 5 days post-wounding¹⁴. Surprisingly, immunoreactivity to both receptors was present in these cells from 12 hours on. It is possible that the epithelial cells at this early stage of repair were using their energy for migration rather than for TGF- β_1 synthesis, since the growth factor is already abundantly available in the wound environment as it is also produced by platelets and macrophages of the inflammatory exudate. From the current study, it is evident that although migrating epithelial cells do not synthesize TGF- β , they are nonetheless equipped to respond to it the moment reepithelialization begins. For this particular cell type, upregulation of receptor expression does not appear to require autocrine production of ligand.

Towards the end of the study period, we noted augmented immunoreactivity for both receptor types within endothelial cells of the granulation tissue, concomitant with increased angiogenesis of the wound bed. This is consistent with the fact that TGF- β_1 exerts an important angiogenic influence via the recruitment of inflammatory cells and the subsequent release of angiogenic factors such as basic fibroblast growth factor and vascular endothelial cell growth factor²⁰. Additionally, TGF- β_1 controls the diameter of newly formed blood vessels²¹.

Excessive dermal scarring in humans is associated with a failure to eliminate TGF- β receptor-overexpressing fibroblasts during granulation tissue remodeling, which leads to a persistent autocrine positive feedback loop that results in over-production of matrix proteins and subsequent fibrosis¹⁷. In the study reported herein, we found that during the proliferative phase of repair, receptor immunostaining remained strongly positive in all dermal fibroblasts, whether the wound was located on the thorax or the

limb and whether it healed normally or developed EGT. However the bandaged limb wounds, in which proud flesh invariably formed, were populated by a large number of fibroblasts, endothelial cells and macrophages, by virtue of the abundant granulation tissue that developed. Each one of these numerous cells continued to strongly express RI and RII until the end of the study period, such that the overall immunostaining intensity of these wounds greatly surpassed that of unbandaged limb wounds healing normally, and of thoracic wounds. Thus, we have substantiated that during the proliferative phase more TGF- β receptors are indeed present in equine wounds healing pathologically, however our study cannot confirm that individual cells are overexpressing RI and RII since the augmented presence of receptors may reflect increased cellularity of the wound at this time. Although our study does not establish a causal relationship, it is tempting to speculate that the presence of more TGF- β receptors within limb wounds at the time of proud flesh formation could lead to greater activity of this fibrogenic growth factor. Furthermore, in view of the positive feedback loop that exists for this particular cytokine, the abundant presence of RI and RII could favor persistent inflammation as well as over-production of ECM components and the subsequent fibrosis often afflicting wound repair at the distal aspect of the equine limb. This, in turn, would further inhibit the contraction process, a phenomenon that has recently been measured in deep dermal wounds of the extremities of horses²². In order to verify these hypotheses, a quantitative assay determining the amount of RI and RII expressed by each individual cell could be used. It would also be of interest to prolong the study to determine whether normal granulation tissue remodeling is associated with a significant decrease in the number of TGF- β receptor-expressing fibroblasts, and whether receptor immunostaining persists in limb wounds with EGT for a long period beyond the proliferative phase, as it does in human hypertrophic scars¹⁷.

In conclusion, the strong presence of RI and RII in connective tissue cells during the proliferative phase of equine cutaneous wound repair, concomitant with the immunoreactivity for TGF- β_1 ligand determined previously¹⁴ lends credence to the proposed significance of this growth factor in the complex regulation of repair. The persistent expression of RI and RII 14 days after injury suggests that the signalling machinery for autocrine stimulation of matrix proteins is in place to contribute to

scarring. Moreover, the information gleaned from these studies may help determine the appropriate time for using receptor antagonists to prevent scarring.

REFERENCES

1. Jacobs KA, Leach DH, Fretz PB, Townsend HGG: Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg* 13: 83-90, 1984.
2. Ashton N, Cook C: *In vivo* observations of the effects of cortisone upon the blood vessels in rabbit ear chamber. *Br J Exp Pathol* 33:445-450, 1952.
3. Balow JE, Rosenthal AS: Glucocorticoid suppression of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 137:1031-1041, 1973.
4. Theoret CL: Growth factors in cutaneous wound repair. *Compendium* 23(4): 383-389, 2001.
5. Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor- β , in Clark RAF (ed): *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (ed 2). New York, NY, Plenum Press, 1996, pp275-308.
6. Shah M, Foreman DM et Ferguson WJ: Neutralization of TGF- β_1 and TGF- β_2 or exogenous addition of TGF- β_3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 108: 985-1002, 1995.
7. Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J, Wrana JL: Identification of human activin and TGF- β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680, 1993.
8. Lopez-Cassilas F, Wrana JL, Massague J: α -Glycan presents ligand to the TGF- β signalling receptor. *Cell* 73:1435-1444, 1993.
9. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J: Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-347, 1994.

10. Lui F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcama J, Harland RM, Massague J: A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381:620-623, 1996.
11. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR: Expression of transforming growth factor β_1 , β_3 and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 30(3):269-277, 2001.
12. Van den Boom R, Wilmlink JM, Wood JM, Ferguson MWJ: TGF- β levels during second-intention healing are related to the different course of inflammation and wound contraction in horses and ponies. *Wound Repair Regen* 10:188-194, 2002.
13. Frank S, Madlener M, Werner S: Transforming growth factors β_1 , β_2 , and β_3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 271:10188-10193, 1996.
14. Theoret CL, Barber SM, Gordon JR: Temporal localization of immunoreactive transforming growth factor β_1 in normal equine skin and full-thickness dermal wound. *Vet Surg* 31(3): 274-280, 2002.
15. Chen RH, Ebner R, Derynck R: Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- β activities. *Science* 260:1335-1338, 1993.
16. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR: Preliminary observations on expression of transforming growth factor β_1 , β_3 and basic fibroblast growth factor in equine limb wounds healing normally or with proud flesh. *Vet Surg* 31(3): 266-277, 2002.
17. Schmid P, Itin P, Cherry G et al: Enhanced expression of TGF- β and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 152:485-493, 1998.

18. Ouellette Y, Doré M, Carrière PD: Evidence in support of a role for transforming growth factor β 1 in limiting oestradiol production in subordinate follicles during selection of the dominant follicle in cattle. *Submitted to Reproduction*.
19. Gold LI, Sung JJ, Siebert JW, Longaker MT: Type I (RI) and Type II (RII) Receptors for Transforming Growth Factor- β Isoforms Are Expressed Subsequent to Transforming Growth Factor- β Ligands during Excisional Wound Repair. *Am J Pathol* 150:209-222, 1997.
20. Phillips GD, Whitehead RA, Knighton D: Inhibition by methylprednisolone acetate suggests an indirect mechanism for TGF- β induced angiogenesis. *Growth Factors* 6:77-84, 1992.
21. Pepper MS, Montesano R: Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff Dev* 32: 319-328, 1990.
22. Wilmink JM, Stolk PWTH, van Weeren PR, Barneveld A: Differences in second intention wounds healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Eq Vet J* 31:53-60, 1999.

5 DISCUSSION

À notre connaissance, ce travail représente la première étude confirmant la présence et décrivant la distribution des récepteurs pour le TGF- β lors de la guérison de plaie chez le cheval. Il a préalablement été démontré que la protéine TGF- β 1 est exprimée selon un patron spatial et temporel distinct à travers les différentes phases de la réparation de plaies excisionnelles (Théorêt et coll., 2002). Puisque la présence de récepteurs détermine la réponse cellulaire, nous avons donc examiné, par immunohistochimie, la localisation de RI et RII durant la réparation normale et pathologique jusqu'à 14 jours après un trauma cutané chez le cheval. Nous avons observé que RI et RII sont constitutivement exprimés dans l'épithélium cutané normal, non-lésé, et que leur expression est positivement régulée et concomitante avec celle de la protéine TGF- β 1 (Théorêt et coll., 2002) dans plusieurs types cellulaires impliqués lors de la guérison. Cela implique une activité spatiale et temporelle potentielle du TGF- β 1, ainsi qu'une régulation autocrine et paracrine de la fonction du TGF- β 1. Il faut noter qu'une expression a été révélée en association avec les fibroblastes de la plaie à des endroits où ont été nouvellement déposées les composantes de la MEC, ce qui est compatible avec le rôle fibrogénique attribué à ce facteur de croissance. Nous avons également observé que dans la peau lésée et non-lésée, les deux récepteurs sont co-localisés. Ceci est cohérent avec le mécanisme de transduction du signal décrit pour le TGF- β , où la présence simultanée de RI et RII est requise pour qu'il y ait une activité due à la liaison de la protéine. Cette information nouvellement acquise devrait aider dans le développement d'antagonistes de ces récepteurs comme approche thérapeutique à la cicatrisation excessive et à la fibrose du derme et potentiellement d'autres organes, et ce chez diverses espèces.

Une étude semblable effectuée chez la brebis (Gold et coll., 1997) a déterminé que l'immunoréactivité pour les récepteurs du TGF- β est retardée de un à cinq jours comparativement à l'immunocoloration de la protéine TGF- β . Les auteurs ont postulé que la présence du TGF- β pouvait positivement réguler la fonction de ses récepteurs, ou que cette période de retard pouvait être due au temps nécessaire à l'activation locale du TGF- β latent. Dans la présente étude, nous avons trouvé que la plupart des types cellulaires expriment RI et RII en même temps que la protéine TGF- β_1 (Théorêt et coll., 2002), à l'exception des macrophages inflammatoires et des cellules épithéliales nouvellement migrantes. Il est possible que les cellules équines répondent plus rapidement à la présence de la protéine, soit comme résultat d'une plus grande concentration de la molécule, soit parce que cette dernière est immédiatement disponible sous sa forme active dans l'environnement de la plaie. Dans le cas des macrophages, nous avons noté une période de latence entre le moment où le ligand est exprimé et celui où les récepteurs peuvent être détectés, ce qui est semblable à ce qui a été rapporté par Gold (Gold et coll., 1997). Il est probable que la régulation positive des récepteurs dans ces cellules inflammatoires équines se produit également très rapidement en réponse à la présence du TGF- β suivant une lésion, cependant, le nombre de récepteurs est peut-être insuffisant pour la détection immunohistochimique. Bien que RI et RII pourraient avoir échappé à la détection par les anticorps choisis dans la période qui suit immédiatement la création de plaie, cela n'indique pas une déficience de l'activité du TGF- β_1 au niveau cellulaire, puisque la protéine exerce une activité régulatrice puissante et pourrait donc ne pas avoir besoin d'un grand nombre de récepteurs pour produire son effet (Roberts et Sporn, 1996).

Dans le cas des nouvelles cellules épithéliales migrantes dérivées des bords de la plaie, une absence de la protéine TGF- β_1 avait préalablement été notée de 12 heures à cinq jours après la création d'une plaie (Théorêt et coll., 2002). Pourtant, l'immunoréactivité pour les deux récepteurs est présente dans ces cellules à partir de 12 heures suivant le trauma. Il se peut que les cellules épithéliales présentes à cette étape précoce de la réparation utilisent leur énergie pour migrer plutôt que pour synthétiser du TGF- β , puisque ce facteur de croissance est disponible immédiatement et en abondance dans l'environnement de la plaie, étant également produit par les plaquettes et les

macrophages de l'exsudat inflammatoire. Dans cette étude, il est évident que même si les cellules épithéliales en migration ne synthétisent pas de TGF- β_1 , elles sont néanmoins équipées pour lui répondre lorsque la réépithélialisation commence. Pour ce type cellulaire particulier, la régulation positive des récepteurs ne semble pas nécessiter une production autocrine de la protéine.

Vers la fin de l'étude, nous avons noté une augmentation de l'immunoréactivité pour les deux récepteurs dans les cellules endothéliales du tissu de granulation concomitante avec une augmentation de l'angiogénèse dans le lit de la plaie. Ceci est compatible avec le fait que le TGF- β_1 exerce un effet angiogénique indirect important via le recrutement de cellules inflammatoires et la relâche subséquente de facteurs angiogéniques comme le bFGF et le VEGF (Phillips et coll., 1992). De plus, le TGF- β_1 contrôle le diamètre des vaisseaux nouvellement formés (Pepper et Montesano, 1990).

La cicatrisation dermique excessive chez l'homme est associée à une incapacité à éliminer les récepteurs pour le TGF- β durant le remodelage tissulaire, ce qui conduit à une boucle de rétroaction positive autocrine persistante qui résulte en une surproduction des protéines matricielles et en une fibrose subséquente (Schmid et coll., 1998). Dans cette étude, nous avons découvert que lors de la phase proliférative de la réparation, l'immunocoloration des récepteurs reste fortement positive dans tous les fibroblastes dermiques, que la plaie soit localisée sur le thorax ou sur les membres, et qu'elle cicatrise normalement ou développe un tissu de granulation excessif. Il y a cependant une exception avec les plaies sous bandage, dans lesquelles un bouton de chair se forme invariablement et dont la population comprend un grand nombre de fibroblastes, de cellules endothéliales et de macrophages. Chacune de ces nombreuses cellules continuent d'exprimer fortement RI et RII jusqu'à la fin de la période de l'étude à un point tel que l'immunocoloration générale de ces plaies surpasse grandement celle des plaies appendiculaires non-bandées qui guérissent normalement ainsi que celle des plaies thoraciques. Nous avons donc fourni la preuve que durant la phase de prolifération, il y a plus de récepteurs pour le TGF- β présents dans les plaies équines qui guérissent de façon pathologique. Cependant, notre étude ne peut affirmer que les cellules individuelles surexpriment RI et RII, puisque cette augmentation de la présence de récepteurs pourrait refléter une augmentation de la cellularité de la plaie à ce

moment. Même si notre étude ne peut établir une relation causale, il est tentant de spéculer que la présence d'un plus grand nombre de récepteurs du TGF- β dans les plaies appendiculaires au moment de la formation du bouton de chair pourrait conduire à une plus grande activité de ce facteur de croissance fibrogénique. De plus, grâce à la boucle de rétroaction positive qui module cette cytokine, l'abondante présence de RI et RII pourrait favoriser une inflammation persistante aussi bien que la surproduction des composantes de la MEC et la fibrose subséquente qui afflige souvent la guérison de plaie à de l'aspect distal du membre du cheval. Cela inhiberait à son tour le processus de contraction, un phénomène qui a été récemment mesuré dans les plaies dermiques des membres des chevaux (Wilmink et coll., 1999). Afin de vérifier ces hypothèses, il faudrait effectuer des essais qui détermineraient la quantité de RI et RII exprimée par cellule (ratio entre la concentration de RI et RII, déterminé par ELISA, et l'ADN de l'échantillon). Il serait aussi intéressant de prolonger cette étude pour déterminer si le remodelage normal du tissu de granulation est associé à une diminution significative du nombre de fibroblastes exprimant les récepteurs pour le TGF- β et si l'expression de RI et RII persiste dans les boutons de chair durant une période qui se prolonge au-delà de la phase de prolifération, comme c'est le cas des cicatrices hypertrophiques humaines (Schmid et coll., 1998).

6 CONCLUSION

La forte présence de RI et RII dans les cellules du tissu conjonctif durant la phase proliférative de guérison de plaie, concomitante avec l'immunoréactivité pour la protéine TGF- β_1 qui a été auparavant déterminée (Théorêt et coll., 2002) ajoutent foi à la signification proposée de ce facteur de croissance dans la régulation complexe de la réparation du derme chez le cheval. L'expression persistante de RI et RII, 14 jours après le trauma suggère que la machinerie de signalement nécessaire à la stimulation des protéines matricielles est en place pour contribuer à la cicatrisation excessive. De plus, les informations glanées de cette étude pourraient aider à déterminer le temps approprié pour l'usage d'antagonistes des récepteurs du TGF- β afin de prévenir la cicatrisation pathologique.

7 BIBLIOGRAPHIE

Andrew RK, Lòpez JA et Brendt MC (1997). Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 29: 91-105.

Attisano L et Wrana JL (2000). Smads as transcriptional co-modulator. *Current Opinion in Cell Biology* 12:235-243.

Attisano L, Wrana JL, Lòpez-Casillas F et Massague J (1994). TGF- β receptors and actions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1222: 71-80.

Barber SM (1990). Second intention wound healing in the horse: The effect of bandages and topical corticosteroids. *Proc AAEP* 3: 107-116.

Bently JP (1967). Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. *Ann Surg* 165: 186-191.

Bertolami CN et Donoff RB (1982). Identification, characterisation, and partial purification of mammalian skin wound hyaluronidase. *J Invest Dermatol* 79: 417-421.

Bertone AL (1989). Second intention healing. *Vet Clin North Am Equine Pract* 5:539-550.

Bogdan C et Nathan C (1993). Modulation of macrophage function by TGF- β , IL-4 and IL-10. *Ann NY Acad Sci* 685: 713-723.

Border WA et Noble NA (1993). Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 10: 1286-1292.

Burkhalter A, Julius DJ et Katzung BG (1998). Histamine, serotonin and the ergot alkaloids. Dans: Basic and clinical pharmacology, 7^e édition (Katzung BG, éditeur). Stamford: Appleton et Lange; 263-264.

Chen X, Rubock MJ et Whitman M (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signaling. *Nature* 383: 691-696.

Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G et Whitman M (1997). Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389: 85-89.

Chettibi S et Ferguson MWJ (1999). Wound repair: an overview. Dans: Inflammation : Basic principles and clinical correlates, 3^e édition (Gallin JI et Snyderman R, éditeurs). New York: Lippincott, William et Wilkins; 865-881.

Clark RAF (1996). Wound repair: Overview and General Considerations. Dans: The molecular and cellular biology of wound repair, 2^e édition (Clark RAF, éditeur). New York: Plenum Press; 3-50.

Clark RAF, Folkvork JM, Hart CE, Murray MJ et McPherson JM (1989). Isoforms of PDGF stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J Clin Invest* 84:1036-1040.

Clark RAF, Quinn HJ, Winn HJ et Colvin RB (1983). Fibronectin beneath reepithelializing epidermis *in vivo*: Sources and significance. *J Invest Dermatol* (Supplément) 80: 26S-30S.

- Colditz IG et MovatHZ (1984). Desensitisation of acute inflammatory lesions to chemotaxis and endotoxins. *J Immunol* 133: 2163-2168.
- Conway EM, Collen D et Carmeliet P (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F et Gabbiani G (1993). Transforming growth factor β_1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103-111.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I et Gabbiani G (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146: 56-66.
- Ehrlich HP, Desmouliere A, Diegelmann RF, Cohen IK, Compton CC, Garner WL, Kapanci Y et Gabbiani G (1994). Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 145:105-113.
- Falanga V et Julien JM (1990). Observations in the potential role of TGF- β in cutaneous fibrosis: Systemic sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 593: 161-171.
- Falloon J and Gallin JI (1986). Neutrophil granule in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 77:653-662.
- Feige JJ, Quirin N et Souchelnitskiy (1996). TGF- β , un peptide biologique sous contrôle : formes latentes et mécanismes d'activation. *Médecine/Science* 12: 929-939.

- Frank S, Madlener M et Werner S (1996). Transforming growth factor β_1 , β_2 et β_3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 271: 10188-10193.
- Gabbiani G, Ryan GB et Majno G (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role of wound contraction. *Experientia* 27: 549.
- Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF et Marquardt H (1988). Molecular events in the processing of recombinant type-1 pre-pro-transforming growth factor- β_1 to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 8: 11951-11958.
- Gipson IK, Spurr-Michaud SJ et Tisdale AS (1988). Hemidesmosomes and anchoring fibril collagen appear synchronously during development and wound healing. *Dev Biol* 126: 253-262.
- Gold LI, Sung JJ, Sielbert JW et Longaker MT (1997). Type I (RI) and type II (RII) receptors for transforming growth factor- β isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor- β ligands during excisional wound repair. *Am J Pathol* 150: 209-222.
- Greenhalgh DG (1998). The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 20: 1019-1030.
- Hakkinen L, Westermarck J, Kahari VM et Larjava H (1996). Human granulation tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF- β_1 . *J Dent Res* 75: 1767-1778.
- Harpel JG, Metz CN, Kojima S, Rifkin DB (1992). Control of transforming growth factor- β activity: latency vs activation. *Prog Growth Factor Res* 4: 321-335.

Hashimoto I, Nakanishi H, Shono Y, Toda M, Tsuda H, et Arase S (2002). Angiostatic effects of corticosteroid on wound healing of the rabbit ear. *J Med Investig* 49: 61-66.

Haslett C et Henson P (1996). Resolution of inflammation. Dans: The molecular and cellular biology of wound repair, 2e édition (Clark RAF, éditeur). New York: Plenum Press; 150-151.

Hebda PA, Collins MA et Tharp MD (1993). Mast cell and myofibroblasts in wound healing. *Dermatol Clin* 11: 685-696.

Hellewell PG, Henson PM, Downey GP et Worthen GS (1991). Control of local blood flow in pulmonary inflammation: role for neutrophils, PAF and thromboxane. *J Appl Physiol* 70: 1184-1193.

Jacobs KA, Leach DH, Fretz PB et Townsend HGG (1984). Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg* 13: 83-90.

Koli KM et Arteaga CL (1997). Processing of the transforming growth factor beta type I and II receptors. Biosynthesis and ligand-induced regulation. *J Biol Chem* 272: 6423-6427.

Koli K, Saharinen J, Hyytiäinen M, Penttinen, C et Keski-Oja J (2001). Latency, activation and binding proteins of TGF- β . *Microsc Res Tech* 52: 354-362.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM et Karlsson S (1993). Growth factor in wound healing sites of mouse skin. *Arch Dermatol Res* 284: 193-197.

- Labbé E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL et Attisano L (1998). Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF- β -dependent transcription through the forkhead DNA binding protein, FAST2. *Mol Cell* 2: 109-120
- Lawrence DA (1996). Transforming growth factor-beta: A general review. *Eur Cytokine Network* 7: 363-374.
- Lawrence DA (2001). Latent-TGF- β : An overview. *Mol Cell Biochem* 219: 163-170.
- Lawrence D, Pircher R, Kryceve-Martinerie C et Jullien P (1984). Normal embryo fibroblasts release transforming growth factor in a latent form. *J Cell Physiol* 121: 184-188.
- Leibovitch SJ et Ross R (1975). The role of the macrophage in wound repair: A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78: 71-100.
- Le Poole et Boyce (1999). Keratinocytes suppress TGF- β_1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes. *Br J Dermatol* 140: 409-416.
- Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF III, Berard CW et Rosen H (1965). The healing of rat skin wounds. *Ann Surg* 242: 293-318.
- Liu F, Pouponnot C et Massagué J (1997). Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF- β -inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 11: 3157-3167.
- Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MWJ, Lorenz HP, Harrison MR et Adzick NS (1994). Adults skin wounds in the foetal environment heal with scar formation. *Ann Surg* 219: 65-72.

- Madri JA, Sankar S et Romanic A (1996). Angiogenesis. Dans: The molecular and cellular biology of wound repair, 2e édition(Clark RAF, éditeur). New York: Plenum Press; 355-368.
- Marieb EN (1999). Le sang. Dans : Anatomie et physiologie humaines. 2^e édition. Saint-Laurent (Québec) : Éditions du Renouveau Pédagogique; 646-648.
- Marieb EN (1999). Le système tégumentaire. Dans : Anatomie et physiologie humaines. 2^e édition. Saint-Laurent (Québec): Éditions du Renouveau Pédagogique; 143-150. .
- Mark RM, Roche WR, Czerniecki M, Penny R et Nelson DS (1986). Mast cell granules cause proliferation of human microvascular endothelial cell. Lab Invest.55(3): 289-294.
- Massague J, Attisano L et Wrana JL (1994). The TGF- β family and its composite receptors. Trends Cell Biol 4: 172-178.
- McCartney-Francis N, Mizel D, Wong H, Wahl L et Wahl SM (1990). TGF- β regulates production of growth factors and TGF- β by human peripheral blood monocytes. Growth Factor 4: 27-35.
- Menger MD et Vollmar B (1996). Adhesion molecules as determinants of disease from molecular to surgical research. Br J Surg 83: 588-601.
- Miller CB, Wilson DA, Keegan KG, Kreeger JM, Adelstein EH et Ganjam VK (2000). Growth characteristics of fibroblasts isolated from the trunk and distal aspect of the limb of horses and ponies. Vet Surg 29: 1-7.
- Miyanoso K, Olofsson A, Colosetti P et Holding C-H (1991). A role of the latent TGF- β_1 -binding protein in the assembly and secretion of TGF- β_1 . EMBO J 10: 99-117.

- Montesano R et Orci L (1988). Transforming growth factor β stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4894-4897.
- Moulin V, Castilloux G, Auger FA, Garrel D, O'Connor-McCourt MD et Germain L (1998). Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 238: 283-293.
- Moulin V, Auger FA, Garrel D et Germain L (2000). Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burn* 26: 3-12.
- Muller WA, Weigl SA, Dend X et Phillips DM (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178: 449-460.
- Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB et Deuel TF (1987). Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor beta. *Science* 237: 1333-1336.
- Nilsson G, Costa JJ et Metcalfe DD (1999). Mast cells and basophils. Dans: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 3e édition (Gallin JI et Snyderman R, éditeurs). New York: Lippincott, William et Wilkins; 97-118.
- Norioka K, Borden EC et Auerbach R (1992). Inhibitory effects of cytokines on vascular endothelial cells: Synergistic interactions among interferon- γ , tumor necrosis factor- α and interleukine-1. *J Immunol* 12 : 13-18.
- Ouellette Y, Doré M, Carrière PD: Evidence in support of a role for transforming growth factor β 1 in limiting oestradiol production in subordinate follicles during selection of the dominant follicle in cattle. *Submitted to Reproduction*.

Pepper MS et Montesano R (1990). Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff Dev* 32: 319-328.

Riches DWH (1996) Macrophage involvement in wound repair, remodelling and fibrosis. Dans: The molecular and cellular biology of wound repair, 2e édition (Clark RAF, éditeur). New York: Plenum Press; 119-121.

Roberts AB et Sporn MB (1996). Transforming growth factor- β . Dans: The molecular and cellular biology of wound repair, 2^e édition (Clark RAF éditeur). New York: Plenum Press; 275-308.

Schiro JA, Chan BMC, Roswit WT, Kassner PD, Pentland AP, Hemler ME, Eisen AZ et Kupper TS (1991). Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell* 67: 403-410.

Schmid P, Itin P, Cherry G, Bi C et Cox DA (1998). Enhanced expression of transforming growth factor- β type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 152(2): 485-493.

Schwartz AJ, Wilson DA, Keegan KG, Ganjam VK, Sun Y, Weber KT et Zhang J (2002). Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am J Vet Res* 63(11): 1564-1570.

Sempowski GD, Borello MA, Blieden TM et coll. (1995). Fibroblast heterogeneity in the healing wound. *Wound Repair Regen* 3: 120-313.

Serini G et Gabbiani G (1996). Modulation of α -smooth muscle actin expression in fibroblasts by TGF- β_1 isoform: an *in vivo* and *in vitro* study. *Wound Repair Regen* 4: 278-287.

- Shah M, Foreman DM et Ferguson MWJ (1992). Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to TGF- β . *Lancet* 339: 213-214.
- Shah M, Foreman DM et Ferguson WJ (1995). Neutralization of TGF- β_1 and TGF- β_2 or exogenous addition of TGF- β_3 to cutaneous rat wound reduces scarring. *J Cell Sci* 108: 985-1002.
- Sherry B, Tekamp-Olson B, Gallegos C, Bauer D, Davatelis G, Wolpe SD, Masiarz F, Coit D et Cerami A (1998). Resolution of the two components of macrophages inflammatory protein-1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein-1 β . *J Exp Med* 168: 2251-2259.
- Silverstein RL (1999). The vascular endothelium. Dans: *Inflammation : Basic principles and clinical correlates*, 3e édition (Gallin JI et Snyderman R, éditeurs). New York: Lippincott, William et Wilkins; 218-220.
- Siméon A (1999). Effet du tripeptide Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu²⁺ sur la cicatrisation dans un modèle de blessure expérimentale chez le rat. Thèse de doctorat, Université de Reims.
- Simpson DM et Ross R (1972). The neutrophilic leucocytes in wound repair: A study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 51: 2009-2023.
- Singer AJ et Clark RAF (1999). Cutaneous wound healing. *New Eng J Med* 341: 738-746.
- Singer II (1979). The fibronexus: A transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. *Cell* 16: 675-685.

Soutchelnitskiy S, Chambaz EM et Feige JJ (1995). Thrombospondins selectively activate one of two latent forms of transforming growth factor- β present in adrenocortical cell-conditioned medium. *Endocrinol* 136: 5118-5126.

Stenn KS et Malhotra R (1992). Epithelialization. Dans: Wound healing: Biochemical and clinical aspects (Cohen IK, Diegelmann RF et Lindblad WJ éditeurs). Philadelphia: WB Saunders; 115-127.

Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, Lin RY et Azdick NS (1995). A model of scarless human fetal wound repair is deficient in TGF- β . *J Pediatr Surg* 30: 198-203.

Svensjö T, Pomahac B, Yao F, Slama J et Eriksson E (2000). Accelerated healing of full-thickness skin wound in a wet environment. *Plast Reconstr Surg* 106: 602-612.

Théorêt CL, Barber SM, Moyana TN et Gordon JR (2001). Expression of transforming growth factor β_1 , β_3 and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 30: 269-277.

Théorêt CL, Barber SM et Gordon JR (2002a). Temporal localization of immunoreactive transforming growth factor β_1 in normal equine skin and full-thickness dermal wound. *Vet Surg* 31: 274-280.

Théorêt CL, Barber SM, Moyana TN et Gordon JR (2002b). Preliminary observations on expression of transforming growth factor β_1 , β_3 and basic fibroblast growth factor in equine limb wound healing normally or with proud flesh. *Vet Surg* 31(3): 266-277.

Tizard I (1982). Type I hypersensitivity: allergies and anaphylaxis. Dans: An introduction to veterinary immunology. 2^e édition. Philadelphia: Saunders; 260-268.

- Tizard I (2000). Innate immunity: inflammation. Dans: Veterinary immunology: an introduction. 6e édition. Philadelphia: Saunders; 37-38. .
- Tonnesen MG, Feng X et Clark RAF (2000). Angiogenesis in wound healing. JID Symposium Proceedings 5(1): 40-46.
- Toole BP (1981). Glycosaminoglycans in morphogenesis. Dans: Cell biology of extracellular matrix (Hay AD éditeur). New York: Plenum press; 259-294.
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L et Wrana JL (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruit Smad2 to the TGF β receptor. Cell 95 779-791.
- Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kahari VM et Saarialho-Kere U (1997). Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcer but not in normally healing wound. J Invest Dermatol 109 : 96-101.
- Van den Boom R, Wilmink JM, O'Kane S, Wood J and Ferguson MWJ (2002). Transforming growth factor- β levels during second intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. Wound Rep Reg 10:188-194.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB et Sporn MB (1987). Transforming growth factor type beta induce monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 5788-5792.
- Wahl LM et Wahl SM (1992). Inflammation. Dans: Inflammation: Basic principles and clinical correlates, 3e édition (Gallin JI et Snyderman R, éditeurs). New York: Lippincott, William et Wilkins; 883-892.

- Walt FM et Jones PH (1993). Expression and function of keratinocyte integrins. Development SS: 185-192.
- Walton GS et Neal PA (1972). Observations on wound healing in the horse. The role of wound contraction. Equine Vet J 4: 93-97.
- Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ et Williams LT (1992). Large Induction of keratinocyte Growth Factor Expression in the Dermis During Wound Healing. Proc Natl Acad Sci USA 89: 6896-6900.
- Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH et Williams LT (1994). The fonction of KFG in morphogenesis of epithlium and reepithelialization of wounds. Science 266: 819-822.
- Whalen GF et Zetter BR (1992). Angiogenesis. Dans: Wound healing: biochemical and clinical aspects. Philadelphia: WB Saunders Company; p. 82.
- Whitby DJ et Ferguson MWJ (1991). Immunolocalization of growth factor in fetal wound healing. Dev Biol 147: 2207-2215.
- Wilmink JM, Nederbragt H, Van Weeren PR, Stolk PWT et Barneveld A (2001). Differences in wound contraction between horses and ponies: the *in vitro* contraction capacity of fibroblasts. Equine Vet J 33: 499-505.
- Wilmink JM, Van Weeren PR, Stolk PWT, Van Mil FN et Barneveld A (1999). Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. Equine Vet J 31: 61-67.
- Wood GC (1960) The formation of fibrils from collagen solutions. Effect of chondroitin sulfate and other naturally occurring polyanions on rate of formation. Biochem J 75: 605-612.

Woodley DT, Yamauchi M, Wynn KC, Mechani G et Briggaman RA (1991). Collagen telopeptide (cross-linking sites) play a role in collagen gel lattice contraction. *J Invest Dermatol* 97: 580-585.

Zhang F, Feng XH et Derynck R (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription. *Nature* 394: 909-913.

Zhou S, Zael L, Lengauer C Kinzler KW et Vogelstein B (1998). Characterization of human FAST-1, a TGF- β and activin signal transducer. *Mol Cell* 2: 121-127.

Zimmerman GA, Prescott SM et McIntyre TM (1992). Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 13:93

Site internet:

www.coursenligne.umontreal.ca/SCRIPT/DMV1210_1_1/scripts/student/serve_page.pl?1041912778+Diapo_cours_05/frame.htm+OFF+Diapo_cours_05/frame.htm

Nom de l'étudiant <i>Isabelle de Martini</i>		Option [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	

Auteurs <i>Isabelle de Martin, BSc et Christine L. Theoret, DVM, PhD, Diplomate ACVS</i>	
Titre <i>Regional localization of immunoreactive type I and II receptors for transforming growth factor β in normal equine skin and in full-thickness dermal wound.</i>	
Revue <i>Surgery</i>	Date de publication <i>Submitted</i>

Déclaration À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).		
Coauteur <i>C. Theoret</i>	Signature [REDACTED]	Date <i>3/04/03</i>
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le *20030407*